



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Efecte hipotalàmic del tungstat de sodi i la seva relació amb la via de la leptina: una possible teràpia antiobesitat

Marta Amigó Correig
Gener 2010



Laboratori de Diabetis i Obesitat



Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Ramon Gomis de Barbarà i de la Dra. Maria del Carmen Carmona Orozco, al Laboratori de Diabetis i Obesitat.

Dr. Gomis de Barbarà

Dra. Maria del Carmen Carmona Orozco

Marta Amigó Correig

MEMÒRIA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTORA PER LA UB

Presentada per:

Marta Amigó Correig

Programa de Doctorat "Biologia i Patologia Cel·lulars" del Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona

Als pares
Al Sergi
Als avis, que els hi
hagués agradat ser-hi

En primer lloc, voldria agrair molt especialment al Dr. Ramon Gomis l'oportunitat que em va donar de treballar al seu laboratori, però sobretot agrair-li la total confiança dipositada en mi i el fet d'escoltar i recolzar totes les meves opinions i decisions. També un especial agraïment a la Dra. Maria del Carmen Carmona. Gràcies per ser una font inesgotable d'idees i per haver participat tan activament en la co-direcció d'aquesta tesi al costat del Dr. Ramon Gomis.

La quantitat d'hores que he passat al laboratori ha fet que algunes persones es convertissin en una segona gran família, celebrant totes les meves victòries (acció molt més important i necessària del que molts es pensen!!) i també eixugant-me les llàgrimes en els (nombrosos) fracassos (em ve al cap la imatge d'una gàbia de ratolins en mans inexpertes, ara fa uns 4 anys...). La família no s'oblida mai, i sé que la tindrè al meu costat vagi on vagi, i això és magnífic. Gràcies als primers germans que vaig tenir, les velles glòries: Palauet (sempre disposada a rebre abraçades), Jordi (el senyor Google), Maria (sempre amb un somriure a la boca) i Marzo (la mama responsable del grup). No només em veu ajudar a començar, sinó que heu estat al meu costat durant tot el camí (i el que encara ens queda!!). Gràcies pels consells, cafès, atencions psicoexpress a qualsevol hora del dia, soparets, excursions... en definitiva, gràcies per tot (la tesis es bueeeeeeeeena!!).

Gràcies també a les obeses, que sense elles això que tenim a les mans no hauria estat possible: Mamen, què t'he de dir... necessitaria un apartat d'agraïments mida enciclopèdia catalana (24 volums + 5 annexos) per dir-te tot el que et mereixes. No només has estat una jefa esplèndida que m'ha ensenyat a estimar la ciència, també t'has convertit en una gran amiga. Barceló, la mama proteòmica... tot i que vas marxar i em vas deixar sola i abandonada amb les mans plenes de spots sense saber què fer-ne, sense la teva ajuda gran part d'això tampoc hauria estat possible, moltes gràcies!

Gracias también a las francesas (incluyendo la suizo-americana-española), que habéis llenado el laboratorio de aire fresco. A Maud, por su tozudez, sus ganas insaciables de saber y conocer, por ser siempre tan alegre, y sobre todo por convertirse una gran gran nueva amiga (s'il te plaît, avoir un peu plus de confiance en toi-même!!!). A Sandra, por ser más dulce que sus postres i por enseñarme que la "s" final no se pronuncia, i a Nathalie, tan seria por fuera, pero un encanto de mujer por dentro!!!

Gràcies a la Sandra Piquer, la reina del Western blot: la teva ajuda durant els últims mesos ha estat fantàstica i imprescindible, moltíssimes moltíssimes gràcies!!! I gràcies a la Julià, la reina de les de les neteges d'armari, sempre contenta i amb un gran somriure a la boca malgrat les circumstàncies...

A la Rosa i la Gemma, pels milers i milers d'intents fracassats de fer funcionar el virus de SOCS3 (l'important és participar....), i a tota la claca del laboratori, Míriam, Esther, Lídia, Yaiza, Ainhoa, Felícia, Montse i Fabian, sempre animant l'ambient i fent que aquest laboratori sigui un fantàstic lloc de treball!

A totes les noves incorporacions dels últims temps, no hem tingut massa temps per conèixe'ns, però molts ànims a vosaltres també, molta sort en tot!

També m'agradaria agrair molt sincerament a l'Analía tota l'ajuda incondicional que m'ha donat, sense esperar mai res a canvi, sempre disposada a contestar tots els meus dubtes "cerebrals", que no han estat pocs!!!!

Als pares, per estar sempre orgullosos de mi i recolzar totes les meves decisions, siguin quines siguin. Si he arribat fins aquí és gràcies a vosaltres!

I a tu, Sergi, perquè amb tu sobren els motius. Gràcies per donar-me el suport, la confiança i l'empenta necessaris per arribar fins aquí.

Índex

Abreviatures	I
I. Introducció.....	1
1. L'obesitat	3
1.1 L'obesitat com a malaltia multifactorial	5
1.2 Complicacions mèdiques derivades de l'obesitat	8
2. L'homeòstasi energètica.....	9
2.1 Regulació de la ingesta	12
2.1.a Centres de regulació de la ingesta.....	13
2.1.b Neuropèptids involucrats en la regulació de la ingesta	16
2.2 Despesa energètica.....	19
3. Leptina: hormona reguladora de l'homeòstasi energètica.....	22
3.1 La leptina	22
3.2 Els receptors de la leptina	25
3.3 Via de senyalització de la leptina.....	27
3.4 Efectes perifèrics de la leptina.....	33
3.5 La resistència a la leptina.....	34
3.6 Models animals deficients en la senyalització de la leptina.....	35
4. Plasticitat neuronal i leptina.....	37
4.1 Desenvolupament de les projeccions neuronals des d'ARC	38
4.2 La leptina i el desenvolupament del cervell	39
4.3 La leptina promou el desenvolupament de les projeccions d'ARC	40
5. El tungstat de sodi	42
5.1 Tractaments actuals contra l'obesitat	42
5.2 Bioquímica i efectes del tungstat de sodi.....	44
II. Materials i mètodes.....	51
1. Cultius cel·lulars	53
2. Expressió proteica.....	55
3. Expressió gènica.....	56
4. Proteòmica.....	63
5. Animals, dietes, tractaments amb tungstat de sodi i manipulació	70
III. Hipòtesi i objectius	79

IV. Resultats	83
1. Efectes de l'administració central de tungstat de sodi. Estudis <i>in vivo</i>	85
1.1 El tungstat de sodi passa la barrera hematoencefàlica.....	85
1.2 El tungstat de sodi té efectes directes sobre el sistema nerviós central	86
1.3 El tungstat de sodi activa la via de senyalització de la leptina <i>in vivo</i>	90
2. Determinació de la diana molecular del tungstat dins la via de la leptina	92
2.1 Caracterització de la línia cel·lular N29/4.....	92
2.2 El tungstat de sodi activa la via de senyalització de la leptina <i>in vitro</i>	95
2.3 El tungstat de sodi regula l'expressió gènica neuronal	98
2.4 El tungstat de sodi actua a través de la via de senyalització de JAK i ERK ...	99
3. Búsqueda de noves dianes moleculars del tungstat a hipotàlem. Estudis proteòmics.	106
3.1 Descripció del model animal utilitzat	106
3.2 Estudi diferencial dels nuclis hipotalàmics ARC, PVN i LHA mitjançant gels 2D-DIGE	109
3.3 Identificació de les proteïnes detectades en els estudis comparatius.....	113
V. Discussió	121
Objectiu I.....	123
Objectiu II.....	132
VI. Conclusions.....	137
VII. Annex.....	141
VIII. Bibliografia.....	145

Abreviatures

AgRP: pèptid relacionat amb la proteïna agouti.

aLCR: líquid cefaloraquidi artificial.

ARC: nucli arcuat.

CART: trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina.

DIO: obesitat induïda per dieta.

DM: diabetis mellitus.

DMH: nucli hipotalàmic dorsomedial.

ERK: cinasa regulada per senyal extracel·lular.

ICV: intracerebroventricular.

IP: intraperitoneal.

JAK2: cinasa janus 2.

LCR: líquid céfalorraquidi.

LHA: àrea lateral hipotalàmica.

MBH: hipotàlem mediobasal.

MC3R/MC4R: receptor 3/4 de la melanocortina.

MCH: hormona concentradora de melanina.

mRNA: àcid ribonucleic missatger.

NPY: neuropeptid Y.

O/N: durant la nit.

Ob: gen codificant per la leptina.

Ob-R: receptor de la leptina.

Ob-Rb: forma llarga del receptor de la leptina.

POMC: Proopiomelanocortina.

PVN: nucli paraventricular.

RNA: àcid ribonucleic.

SNC: sistema nerviós central.

SNS: sistema nerviós simpàtic.

SOCS3: supressor de la senyal de citocines 3.

STAT3: senyal transductor i activador de la transcripció 3.

TG: triglicèrid

VMH: hipotàlem ventromedial.

W: Tungstat de sodi.

α -MSH: hormona estimuladora del melanòcit.

I. Introducció

Sigueu realistes, demaneu l'impossible.

Maig del 68.

1.- L'OBESITAT

L'obesitat, tal i com descriuen els estudis realitzats per l'Organització Mundial de la Salut (OMS), ha esdevingut una pandèmia: més de mil milions d'adults pateixen sobrepès i 250 milions són clínicament obesos. El progressiu augment en el consum de dietes amb alt contingut calòric, juntament amb la disminució de l'activitat física, tan freqüent en societats industrialitzades, ha triplicat el nombre de casos d'obesitat des dels anys 80 [1]. L'obesitat és doncs un problema global en el que intervenen múltiples variables que van des de l'àmbit econòmic al social, passant evidentment per l'àmbit sanitari, i és imperatiu trobar solucions a aquesta epidèmia.

Definició d'obesitat i sobrepès

L'obesitat es pot definir com una malaltia en que l'excés de greix corporal s'ha acumulat de tal manera que pot afectar negativament la salut [2].

En la pràctica clínica, el greix corporal és l'estimació més comuna per detectar l'obesitat. La fórmula més utilitzada en estudis epidemiològics és l'índex de massa corporal (BMI), consistent en el càlcul de pes (Kg) dividit per l'alçada (m) al quadrat [3]. A la Taula 1 es representen els punts de tall proposats per la OMS per la classificació del sobrepès. L'hipòtesi subjacent d'aquesta fórmula és que la variació de pes en persones de la mateixa alçada és deguda a la massa adiposa.

BMI (Kg m ⁻²)	Classificació OMS	Descripció popular
< 18,5	Infrapès	Prim
18,5-24,9	-	Saludable
25,0-29,9	Grau 1 de sobrepès	Sobrepès
30,0-39,9	Grau 2 de sobrepès	Obesitat
≥40	Grau 3 de sobrepès	Obesitat mòrbida

Taula 1. Punts de tall proposats per l'OMS per la classificació del sobrepès [2].

Una classificació gradual del sobrepès i l'obesitat mitjançant els valors de BMI proporciona informació valuosa sobre l'increment de la massa corporal que permet fer comparacions significatives de pes, dins i entre les poblacions i la identificació d'individus i grups en situació de risc de morbiditat i mortalitat. Aquesta mesura també permet la identificació de prioritats per la intervenció en un individu o comunitat, i per avaluar l'eficàcia de tals intervencions. És important tenir en compte que, degut a les diferències en proporcions corporals, el BMI pot no correspondre al mateix grau d'obesitat en diferents poblacions. Tampoc té en compte l'àmplia variació en la naturalesa de l'obesitat entre els diferents individus i les poblacions. Tot i això, degut a la gran complexitat per definir la condició d'obesitat, l'OMS ha proposat aquesta classificació com a estàndard, i aplicable tant a homes com a dones i als diferents grups d'edat, ja que de moment és la mesura més ajustada [4].

En diferents estudis epidemiològics s'ha vist que existeix una estreta relació entre el BMI i la incidència de diverses malalties cròniques provocades per l'excés de greix, com la diabetis tipus 2, la hipertensió arterial i cardiopaties isquèmiques. Aquesta relació és aproximadament lineal per BMI's inferiors a 30, i per sobre d'aquest valor aquests riscos es veuen incrementats, independentment de les qüestions de gènere [5].

Estudis epidemiològics

Per definir l'obesitat com a pandèmia i com a problema de salut pública capdavanter, només cal que ens fixem en la seva evolució en els darrers anys. La malaltia es troba estesa tant en països industrialitzats com en països en vies de desenvolupament, i es calcula que entre el 50 i el 60% de la població pateix sobrepès o obesitat [6].

Als Estats Units de Nord-Amèrica, les quotes de sobrepès i obesitat s'alcen fins al 60% en adults i 30% en infants i adolescents [7], i les morts relacionades amb la patologia ascendeixen anualment a 300.000, esdevenint una de les primeres causes de

mort en aquest país. Diversos estudis també han constatat que no hi ha diferències de tendències entre sexes, edats ni grups ètnics [8].

El Regne Unit presenta un percentatge de població adulta obesa del 24%, Espanya i Alemanya del 14.5% , i Itàlia, França i Suècia presenten nivells menors amb un 7%. Si considerem conjuntament l'obesitat i el sobrepès, la major prevalença s'observa a Grècia, Espanya, Alemanya i Regne Unit amb valors al voltant del 35%, afectant més a les dones que als homes [9, 10].

Però l'augment de la prevalença de l'obesitat no és exclusiu de països desenvolupats, és en els països considerats en vies de desenvolupament on s'està registrant un major augment en la incidència de la malaltia i està esdevenint un important problema sanitari [11].

1.1 L'OBESITAT COM A MALALTIA MULTIFACTORIAL

L'obesitat no és un desordre únic i simple, sinó que està causada per un grup heterogeni de condicions amb múltiples causes. El pes corporal està determinat per condicions genètiques, factors ambientals i psicosocials que actuen a través de mediadors fisiològics de la ingesta i despesa energètica. Tot i que les diferències genètiques són indubtablement importants, el marcat augment en la prevalença de l'obesitat es pot explicar, en part, pels canvis socials i ambientals que han resultat dels avenços tecnològics [2].

Factors genètics

La vessant genètica ha estat fonamental en el recent avenç que s'ha realitzat en el camp de la regulació del pes corporal. La majoria de mutacions detectades en rosegadors han estat clonades i han permès la identificació de mutacions homòlogues que, en humans, són responsables del desenvolupament d'obesitat. Aquests gens han

permès descriure o ampliar el coneixement de certes vies bioquímiques implicades en la regulació de la homeòstasi energètica [2].

Les evidències indiquen que l'obesitat és una patologia que pot ser modulada per múltiples gens que estableixen una complexa xarxa de comunicació entre ells i amb factors ambientals, com poden ser la dieta i l'activitat física entre d'altres [12].

Les influències genètiques semblen actuar, en la gran majoria dels casos, a través de gens de susceptibilitat. Aquests gens poden conferir una predisposició a patir la malaltia, però no són ni essencials ni suficient per a desenvolupar-la.

Durant els darrers anys s'han dut a terme nombrosos estudis amb l'objectiu d'identificar la base genètica d'aquesta predisposició i determinar gens candidats. En aquest sentit, l'avenç més espectacular ha estat el descobriment del gen *ob* i del seu producte, la leptina. La hipòtesi immediata, que postulava que l'obesitat humana podria ser producte d'una deficiència d'aquesta proteïna, va ser truncada en comprovar-se que l'obesitat humana transcorre amb elevades concentracions d'aquesta hormona [13]. Tot i haver estat identificat el gen *ob* en humans, les alteracions genètiques d'aquest gen són extremadament rares [14, 15], i causen un fenotip d'hiperfàgia, hipogonadisme i obesitat mòrbida. La cerca d'una hipòtesi per tal d'explicar els elevats valors de leptina en humans obesos, va permetre descobrir el gen codificador del receptor de la leptina (*Lepr*) [16]. Altres mutacions monogèniques descrites en humans que causen obesitat són la mutació sobre el gen de POMC [17] i PC1 [18], ambdues amb pocs casos descrits, i la mutació sobre el gen de MCR4, aquest últim força més prevalent, ja que es detecta entre el 3 i el 5 % d'individus amb obesitat mòrbida.

Malgrat tot, les mutacions comentades únicament poden explicar un percentatge ínfim de la prevalença de l'obesitat. En la majoria de casos, el desenvolupament de l'obesitat obeeix a una raó poligènica, en que la combinació d'aquests i/o altres gens, conjuntament amb factors ambientals, incrementa la susceptibilitat a desenvolupar obesitat a través de diferents mecanismes.

Factors ambientals

Els factors ambientals poden emmascarar les tendències latents per desenvolupar obesitat. Les prediccions sobre possibles interaccions entre gens i ambient són difícils de determinar, ja que hi podria haver retards en l'exposició d'un individu a un ambient "obesogènic" i/o alteracions en l'estil de vida [2].

Però, com és que el genoma humà, tot i que conté una bateria gènica tan àmplia, permet una acumulació de greix que esdevé excessiva i fins i tot patològica? La resposta pot estar en la teoria del gen estalviador (*thrifty gene*) formulada per Neel [19]. En aquesta teoria es suggereix que la gran capacitat d'emmagatzemar energia en forma de greix és un mecanisme de defensa que hauria facilitat la supervivència dels nostres antecessors en els primers temps de la presència humana a la terra. La successió de diversos períodes en els que l'aliment escassejava, va afavorir la supervivència d'aquells individus que eren capaços d'emmagatzemar més eficientment les calories ingerides durant períodes d'excés d'aliments, en detriment d'aquells individus desproveïts d'aquesta capacitat. Aquestes èpoques de fam s'han repetit periòdicament durant la història de la humanitat, fent possible la selecció d'una població amb un alt potencial d'emmagatzemar energia. Desafortunadament, dos successos claus en la història recent han fet manifestar la tendència a desenvolupar obesitat en aquesta població seleccionada. Per una banda la revolució industrial, durant la qual els humans van desenvolupar màquines capaces de realitzar les tasques que fins aquell moment feien els homes, causant una disminució important de la despesa energètica diària. En segon lloc, i més recentment, la globalització de la cultura occidental, caracteritzada per un fàcil accés a dietes palatables i d'alt contingut calòric, i una vocació sedentària amb activitats lúdiques dominades per la televisió i els ordinadors [20]. Tot això ha provocat que l'avantatge genètica que ens aportava el "gen estalviador" s'hagi girat en contra nostra, fent que el que en principi era un caràcter genètic adaptatiu, hagi deixat de ser-ho [21].

Factors culturals

L'evidència del paper crític dels factors ambientals en el desenvolupament de l'obesitat ve dels estudis de migracions i l'occidentalització de les dietes i l'estil de vida dels països desenvolupats. Canvis marcats en el BMI són observats freqüentment en estudis de migracions, on poblacions amb una genètica comuna viuen sota circumstàncies ambientals diferents. Per exemple, els Indis Pima que viuen als Estats Units són, de mitjana, 25Kg més pesats que els Indis Pima que viuen a Mèxic [22]. S'observa una tendència similar en els africans que viuen als Estats Units. A Nigèria, la mitja de BMI per homes i dones és de 21,7 i 22,6 respectivament; als Estats Units les mitges de BMI són de 27,1 pels homes i de 30,8 per les dones [23].

Hi ha moltes variacions de pes entre diferents grups ètnics encara no explicades (als Estats Units, el 22% de les dones caucàsiques són obeses, ho són el 30% de les dones afroamericanes i el 34% de les dones mexico-americanes) [24].

En els països industrialitzats, una major prevalença de sobrepès i obesitat s'observa en aquells nivells més baixos d'educació i ingressos, tot i que es dona la situació inversa en els països en vies de desenvolupament [23].

1.2 COMPLICACIONS MÈDIQUES DERIVADES DE L'OBESITAT

L'obesitat no només és un problema per si mateixa, sinó que a més agreuja o causa molts problemes addicionals en la salut [2]. En particular, s'associa al desenvolupament de diabetis tipus 2, malalties coronàries, certs tipus de càncer, complicacions respiratòries (apnea obstructiva), osteoartritis [2], dolors i molèsties i suor excessiva, entre d'altres. L'obesitat també comporta una estigmatització social i discriminació, tot això contribuint a la baixa qualitat de vida i fins i tot depressions [25].

L'augment del greix corporal s'acompanya de canvis importants en la funció fisiològica. Aquests canvis són, en certa mesura, depenents de la distribució regional del teixit adipós. L'obesitat generalitzada dona lloc a alteracions en el volum total de sang i en la funció cardíaca, mentre que la distribució del greix al voltant de la caixa

toràcica i abdomen restringeix i altera la funció respiratòria. Els dipòsits de greix viscerals intra-abdominals són els principals causants del desenvolupament d'hipertensió, l'increment de concentració d'insulina en plasma i resistència a la insulina, diabetis mellitus i hiperlipidèmia [2].

És doncs un fet ineludible que l'obesitat dóna lloc a una gran càrrega sanitària amb importants implicacions en els pressupostos i despeses mèdiques [25].

2.- HOMEÒSTASI ENERGÈTICA: CONTROL DEL PES CORPORAL

L'homeòstasi energètica consisteix en la interrelació dels processos integrats pel cervell per mantenir l'energia emmagatzemada en un nivell adequat segons les condicions ambientals. Així, l'homeòstasi energètica inclou la regulació dels nivells de nutrients en òrgans clau d'emmagatzematge (p.ex. el greix al teixit adipós i el glicogen al fetge), així com en la sang (p.ex. la glucosa en sang). Per aconseguir aquest objectiu, el cervell rep informació contínua sobre l'energia emmagatzemada i els fluxos en òrgans crítics sobre l'aliment que s'ha d'ingerir i absorbir, i sobre l'energia basal o segons la situació que els òrgans necessiten [26].

L'obesitat és el resultat dels desequilibris en l'homeòstasi energètica. Si visualitzem l'organisme des d'una perspectiva termodinàmica, veiem que l'energia emmagatzemada (greix) és igual a l'energia administrada (nutrients) menys la despesa energètica (conversió de nutrients i oxigen en diòxid de carboni, aigua i calor) realitzada per l'organisme, més el treball realitzat sobre el medi. Així doncs, aplicant les lleis de la termodinàmica podem descriure l'obesitat amb la següent equació:

$$\begin{array}{rcc} \text{Energia acumulada} = & \text{Energia administrada} - & \text{Despesa energètica} \\ \text{(adipositat)} & \text{(ingesta)} & \text{(treball + calor)} \end{array}$$

D'aquesta forma, la ingesta i la despesa energètica són els punts essencials en la regulació del balanç energètic i l'obesitat. El coneixement de la regulació d'ambdós processos està esdevenint prioritari des de fa diverses dècades, amb la finalitat d'esbrinar mecanismes d'actuació per aturar l'obesitat.

La regulació del balanç energètic resulta força complexa, i està controlada per múltiples factors genètics i ambientals, com la diversitat de les dietes, l'activitat física, alguns fàrmacs o productes químics, que actuen sobre un o ambdós extrems de la balança energètica [27]. El nostre organisme té capacitat per rectificar els petits desequilibris que es produeixen en el balanç energètic (ningú s'engreixa per un àpat copiós o per romandre un període curt sense activitat física). Així doncs, l'organisme reacciona modificant els nivells de despesa energètica o d'ingesta, en funció de la situació energètica d'un moment determinat. El problema de l'obesitat esdevé quan aquests desequilibris es mantenen durant un temps perllongat [28].

Fa més de 50 anys que s'ha establert el model de "regulació negativa d'adipositat", fonamentat en la premissa que senyals circulants informen al sistema nerviós central (SNC) dels canvis en la composició i en la quantitat de teixit adipós, i que en resposta a aquests senyals, el cervell organitza els canvis adaptatius en el balanç energètic necessaris per corregir i estabilitzar els nivells corporals de teixit adipós [29].

El criteris proposats per als senyals de regulació negativa de l'adipositat són:

- i) Han de circular a nivells proporcionals a la massa adiposa, i han de poder traspasar la barrera hematoencefàlica.
- ii) Han de promoure la pèrdua de pes corporal mitjançant l'acció sobre els sistemes neuronals implicats en el control de la homeòstasis energètica.
- iii) El blocatge d'aquestes accions neuronals incrementa la ingesta i el pes corporal.

Tot i que múltiples nutrients (p.ex. àcids grassos i glucosa), citocines (p.ex. IL-6 i TNF α) i hormones (p.ex. adiponectina i glucocorticoides) compleixen alguns d'aquests criteris, fins el moment només s'ha descrit la leptina i la insulina com a úniques molècules que compleixen íntegrament els tres criteris [26, 30, 31].

La insulina, que es va observar que entrava al cervell des de la circulació sistèmica [32] i que produïa una disminució de la ingesta [33], va ser la primera hormona que es va implicar en el control del pes corporal mitjançant el SNC. Posteriorment, i arrel de la demostració de l'obesitat i la hiperfàgia severa que presentaven els ratolins *ob/ob* com a conseqüència de la mutació en el gen codificant per la leptina [34], es va determinar aquesta hormona com a segon senyal d'adipositat. Ambdues hormones circulen a nivells proporcionals a l'adipositat corporal [35, 36], traspassen la barrera hematoencefàlica [32, 37], presenten receptors en neurones involucrades en la ingesta [38, 39], la seva administració directa en cervell redueix la ingesta [33, 40, 41], mentre que la deficiència d'aquestes hormones produeix l'efecte oposat [34, 42].

Diverses observacions en estudis genètics i farmacològics [34, 43] han suggerit un rol més crític de la leptina que no pas de la insulina en el control de la homeòstasis energètica a nivell de SNC. Per exemple, la deficiència en leptina provoca obesitat severa i hiperfàgia, tot i l'elevada concentració d'insulina dels individus. Per contra, la deficiència en insulina no indueix obesitat.

Existeix un ampli consens en considerar l'hipotàlem com el principal centre integrador d'aquests senyals reguladors d'adipositat del SNC, i per tant el principal lloc de control de la ingesta i la despesa energètica. Aquest sistema inclou diverses àrees (hipotalàmiques i extrahipotalàmiques) i complexes interconnexions entre elles. Els sistemes neuronals permeten determinar els requeriments energètics de l'organisme i, en conseqüència, regular la ingesta a nivell de la durada i la quantitat dels àpats, i el control de la composició en certes circumstàncies, així com ajustar els processos termogènics que controlen la despesa energètica.

El paper de l'hipotàlem com a centre regulador de la ingesta i del pes corporal va ser establert l'any 1940 per Hetherington i Ranson mitjançant experiments de lesió [44]. Anand i Brobeck [45] van precisar la funció de diferents parts de l'hipotàlem, atribuint a l'àrea lateral hipotalàmica (LHA) i a l'hipotàlem ventromedial (VMH) els qualificatius de "centre de la gana" i "centre de la sacietat" respectivament. La intensa recerca desenvolupada en aquest camp ha contribuït a identificar diversos neurotransmissors i receptors, i a descriure altres circuits de control, que han obligat a

abandonar aquest concepte dual, alhora que excessivament simplista, a favor d'un concepte més complex en el que els sistemes de regulació impliquen altres regions. L'hipotàlem, anatòmicament i histològicament, és una regió altament complexa i crítica per la regulació de la homeòstasi energètica en els organismes superiors. La precisió i l'efectivitat en l'elaboració de respostes no seria possible sense l'existència d'un elevat grau d'especialització i interconnexió entre les diferents regions que el formen. En aquest sentit, s'han descrit diverses regions hipotalàmiques implicades en la regulació de la homeòstasi energètica, com el nucli arcuat (ARC), el VMH, l'LHA, l'hipotàlem dorsomedial (DMH) i l'hipotàlem paraventricular (PVN), entre d'altres. Aquestes regions es caracteritzen per la presència de determinades subpoblacions neuronals que expressen diferents receptors pels diferents senyals integradors dels sistemes de regulació, així com per les connexions amb d'altres regions hipotalàmiques i extrahipotalàmiques.

2.1 REGULACIÓ DE LA INGESTA

La regulació de la ingesta és important, ja que modula la part del balanç energètic corresponent a l'aportació energètica. La ingesta inclou diversos aspectes, com els patrons d'ingesta (mida i freqüència dels àpats), la tria entre dietes d'elevat o de baix contingut lipídic, la densitat energètica dels nutrients consumits, la varietat d'aliments acceptats, la palatabilitat de la dieta i la variabilitat d'aquesta entre els diferents àpats. La ingesta està controlada per senyals hormonals de curta durada, senyals psicològics i senyals neurals que es deriven del tracte gastrointestinal com la colecistoquinina (CKK) o la ghrelina. Altres senyals hormonals com la insulina i la leptina, juntament amb els nutrients circulants, indiquen els nivells de reserves energètiques de l'organisme, i per tant són senyals de llarga durada. Tots aquests senyals actuen a nivell del SNC, convergint en l'hipotàlem, que expressa un elevat nombre de pèptids i neurotransmissors que influiran en la ingesta (taula 2).

Senyals orexigènics	Senyals anorexigènics
1. Neuropèptid Y (NPY)	1. Trànscrip regulat per cocaïna i amfetamina (CART)
2. Pèptid relacionat amb la proteïna agouti (AgRP)	2. Melanocortines (POMC)
3. Hormona Concentradora de Melanina (MCH)	3. GLP1
4. Orexines/hipocretines	4. Leptina
4. Ghrelina	5. Insulina
5. Galanina	6. Factor alliberador de corticotropina (CRF)
6. Opioides endògens	7. CCK
7. Endocannabinoids	8. Serotonina
	9. Neurotensina
	10. Pèptid YY
	11. Amilina
	12. Bombesina

Taula 2. Senyals involucrats en la regulació de la ingesta (adaptat d'Arora, S. [46])

2.1.a Centres de regulació de la ingesta

Les regions hipotalàmiques involucrades en el control de la ingesta són nombroses i formen una complexa xarxa d'interconnexions i senyals (figura 1). Les àrees més destacades en el control de l'homeòstasi energètica són:

Nucli Arcuat (ARC): actua com a centre de control de la gana i integra senyals hormonals [47]. ARC inclou el tercer ventricle i està en contacte amb el nucli de l'eminència arcuada, amb qui conjuntament estableixen una de les àrees del cervell on la barrera hematoencefàlica està especialment modificada per permetre l'entrada de pèptids i proteïnes perifèriques, incloent-hi la leptina i la insulina [48, 49]. ARC conté principalment dues poblacions de neurones, la primera que coexpressa el neuropèptid Y (NPY) i el pèptid relacionat amb la proteïna agouti (AgRP), i la segona que coexpressa el precursor de la melanocortina, proopiomelanocortina (POMC) i el trànscrip relacionat amb cocaïna i amfetamina (CART), essent tots ells neuropèptids importants en la regulació de l'homeòstasi energètica. Així, ARC és una àrea del cervell privilegiada

que pot permetre la transmissió dels senyals hormonals perifèrics. Les neurones d'aquest nucli tenen projeccions cap a moltes altres regions de l'hipotàlem, sobretot al nucli paraventricular (PVN) [50].

Nucli Paraventricular (PVN): regula funcions autonòmiques i neuroendocrines per modular la despesa energètica, així com contribuir en els senyals de sacietat. Es situa proper a la part superior del tercer ventricle, i és el lloc de major secreció de les hormones alliberadores de corticotropina (CRH) i tiotropina (TRH). En aquest nucli convergeixen múltiples vies i senyals neuronals implicats en el balanç energètic, incloent-hi projeccions de neurones NPY del nucli ARC, orexines, hormona estimuladora de melanòcit o melanocortina (α -MSH) derivada de POMC, i la galanina, pèptid estimador de la ingesta. Així doncs, el PVN té un rol important en la integració de senyals nutricionals en l'eix hipotalàmic-hipofisari-tiroideu [51].

Nucli Ventromedial (VMH): actua principalment com a centre de sacietat i s'ha identificat com un altre punt clau d'actuació de la leptina. Satoh i col·laboradors van demostrar que lesionant aquesta zona de l'hipotàlem, es provoca hiperfàgia i obesitat [52]. Les neurones VMH contribueixen a les projeccions estimuladores cap a les neurones POMC d'ARC, i la magnitud inhibidora o excitadora d'aquests senyals de sortida varia amb els nivells de leptina i l'estat nutricional [50].

Nucli Dorsomedial (DMH): rep nombroses projeccions neuronals des d'ARC i innerva densament PVN. Està implicat en funcions d'integració i processament de la informació provinent d'aquests nuclis [50, 53]. Lesions en aquest nucli alteren la ingesta. Els nuclis ARC, VMH i DMH treballen conjuntament amb el nucli PVN com un circuit interconnectat, amb la leptina actuant via els seus receptors de cada regió per modular els senyals de sortida de PVN [50] (figura 1).

Àrea lateral (LHA): aquest és el centre clàssic de la gana, conté neurones sensibles a glucosa que són estimulades per episodis d'hipoglucèmies, i és crucial en la

mediació de la hiperfàgia causada per aquests episodis [54]. L'ablació d'aquest nucli atenua la ingesta, suggerint un paper important en la seva regulació [50].

Bulb raquidi: Existeixen múltiples interconnexions recíproques entre l'hipotàlem i el bulb raquidi, particularment amb el nucli del tracte solitari (NTS) [55, 56]. El NTS presenta una alta densitat de receptors per NPY, en concret el Y_1 i el Y_5 [57, 58]. Els nivells de NPY en el NTS fluctuen amb la ingesta [59], i les neurones NPY d'aquesta regió tenen projeccions cap al PVN. També hi ha evidències d'una actuació del sistema de la melanocortina en el NTS independent del nucli ARC [60]. Aquesta regió també regula la quantitat d'aliments ingerits en cadascun dels àpats, incrementant-les quan es redueix la freqüència d'ingestes diàries. Aquests senyals de sacietat causats pels àpats estan conduïts per les fibres aferents del nervi vague, des del tracte gastrointestinal al bulb raquidi [61].

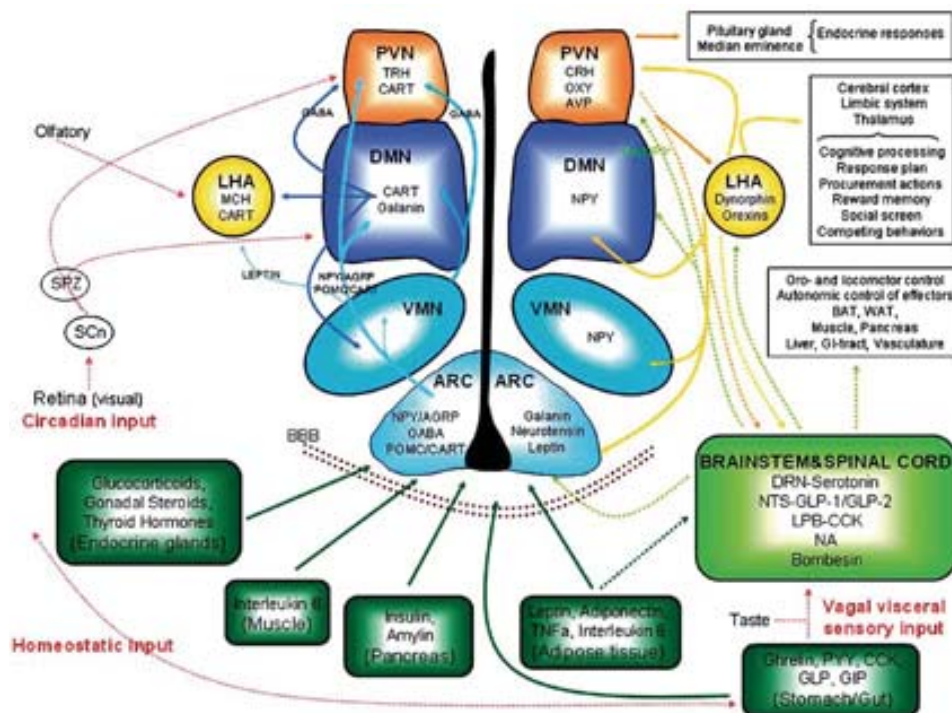


Figura 1. Visió esquemàtica del circuit del sistema nerviós central, els neuropèptids i els neurotransmissors involucrats en el control de la ingesta i el pes corporal [62].

2.1.b Neuropeptids involucrats en la regulació de la ingesta

Tal i com es descriu en la taula 2, hi ha un elevat nombre de neuropeptids que regulen positivament o negativament la ingesta.

La història dels neuropeptids es va iniciar al 1970, quan es va introduir el terme "neuropeptid". Es van definir com a fragments d'hormones peptídiques sense la mateixa activitat que les hormones, però capaços de produir efectes per si sols.

Els neuropeptids són peptids o fragments de peptids sintetitzats a les cèl·lules, que actuen modulant l'activitat neuronal en conjunció amb neurotransmissors co-localitzats [63].

En aquesta tesi ens limitarem a descriure aquells neuropeptids de major rellevància i que es relacionen notablement amb la leptina.

NPY: és un dels neuropeptids més abundants de l'hipotàlem [64] i un dels factors orexigènics més potents [65, 66]. L'administració intracerebroventricular (ICV) d'aquest neuropeptid en rata causa un increment potent i perllongat de la ingesta, a més, l'administració crònica provoca hiperfàgia, reducció de la despesa energètica i obesitat [67]. Aquest neuropeptid també està implicat en processos com la regulació de la termogènesi, la funció cardiovascular, el control d'eixos neuroendocrins, els desordres afectius i en processos relacionats amb la memòria [68]. El nucli ARC és el lloc de major expressió de neurones que contenen NPY en l'hipotàlem, i aquestes neurones tenen projeccions cap a altres nuclis com PVN, DMH i LH (figura 2). L'expressió de NPY a hipotàlem s'ha descrit que està augmentada en diversos models animals amb obesitat i/o alteracions en la ingesta [69]. NPY actua unint-se a un receptor de membrana acoblat a proteïna-G, del que es coneixen cinc isoformes (Y_1, Y_2, Y_4, Y_5 i Y_6), per mitjançar les seves funcions amb una disminució de l'adenilat ciclasa que provoca la reducció dels nivells d'AMPc [70]. Aquests receptors de NPY es troben distribuïts amb diferents patrons en les diverses àrees de l'hipotàlem, el que esdevé un punt de regulació de les diverses funcions del neuropeptid. A nivell del control de la ingesta, NPY actua a través dels receptors Y_1 i Y_5 expressats principalment en el nucli ARC, en l'LHA i en el PVN [66, 71]. Les neurones NPY són una diana

hipotalàmica potencial per la leptina, que causa la inhibició de la síntesis del neuropèptid [70, 71].

AgRP: és un pèptid que s'expressa a nivell de tot l'organisme i que a més de ser un factor orexigènic, exerceix múltiples funcions, com el control de la coloració del pelatge, l'obesitat, la resistència a la insulina, la glicèmia i la taxa de creixement. A nivell hipotalàmic, AgRP està expressat exclusivament en el nucli ARC, i més concretament en neurones que coexpressen NPY [72-74]. Tal com passa amb NPY, l'increment en l'expressió d'aquest neuropèptid també es relaciona amb un increment de la ingesta, i la seva expressió també està inhibida per la leptina. AgRP actua sobre el balanç energètic, antagonitzant de forma potent i selectiva els receptors MC3R i MC4R, que són els receptors sobre els que actua la melanocortina per disminuir la ingesta i incrementar la despesa energètica [75]. A diferència del curt temps d'acció del NPY, la AgRP té un temps d'acció perllongat: una única dosi de AgRP administrada a nivell central és capaç d'incrementar la ingesta per un període superior a una setmana [76].

α -MSH: és un neurotransmissor amb funció anorèctica. Està englobat en el grup de les melanocortines, que són pèptids bioactius derivats de la molècula precursora POMC, a través d'un procés de segmentació post-traducciona específic de teixit. El gen de POMC s'expressa de forma fisiològica en diversos teixits de mamífers com a la pell, al sistema immunològic, a la hipòfisi i en neurones hipotalàmiques [77, 78]. El pèptid bioactiu generat a partir de POMC en les neurones hipotalàmiques, l' α -MSH, actua com a lligand del receptor MC4R, que s'ha demostrat clau en el control de la ingesta i de l'homeòstasi energètica [79]. En aquest receptor, juntament amb el receptor MC3R, és capaç d'actuar-hi AgRP, alhora que hi actuen els seus agonistes [51]. α -MSH provoca la disminució de la ingesta i una reducció del pes corporal [80]. A més, s'ha observat que l' α -MSH provoca una inhibició dels efectes orexigènics de l'AgRP, indicant que existeix un sistema dinàmic en el control de la ingesta en el que intervenen les neurones AgRP i POMC [76]. POMC es coexpressa amb CART en neurones del nucli ARC, i aquestes neurones poden ser estimulades directament per la

leptina [81]. L'administració de leptina en ratolins *ob/ob* incrementa l'alliberament de l' α -MSH al torrent circulatori, suggerint un *loop* de regulació entre la leptina i l' α -MSH [82].

CART: és un neuropèptid amb un potent senyal anorèctic. L'elevada conservació d'aquest neuropèptid entre organismes superiors, suggereix que ha de tenir una funció rellevant en la fisiologia dels mamífers [83]. Els pèptids de CART es localitzen en àrees específiques de l'hipotàlem com PVN, DMH, LH i el nucli ARC, que estan relacionades amb la ingesta [84], processos de recompensa i reforçament de la conducta, processos sensorials, estrès i regulació endocrina [85, 86]. La funció anorèctica de CART queda palesa amb les següents evidències: i) l'administració de sèrums anti-CART incrementa la ingesta nocturna, ii) el dejú causa una reducció dels nivells de mRNA de CART en el nucli ARC [87], iii) l'administració de CART és capaç de bloquejar la ingesta en resposta a NPY [86-88]. Existeixen evidències que relacionen les vies de senyalització de la leptina i de CART, a més, les neurones hipotalàmiques que expressen CART també expressen el receptor de leptina, i els ratolins *ob/ob* tenen els nivells de CART reduïts en el nucli ARC, però en administrar leptina, els nivells de CART es normalitzen [86, 88, 89].

En el cas d'aquests quatre neuropèptids s'ha establert una clara relació amb la regulació de la ingesta mitjançada per la leptina, a més d'una regulació de la despesa energètica. Així, aquests neuropèptids esdevenen la base de la regulació de la homeòstasi energètica [90]. No obstant hi ha altres mecanismes de regulació de la ingesta com els mecanismes de recompensa i els de percepció de la sacietat. La regulació d'aquests mecanismes també controla la ingesta, però en canvi, no intervé en la despesa energètica, a diferència de la regulació neuronal per senyals d'adipositat [91].

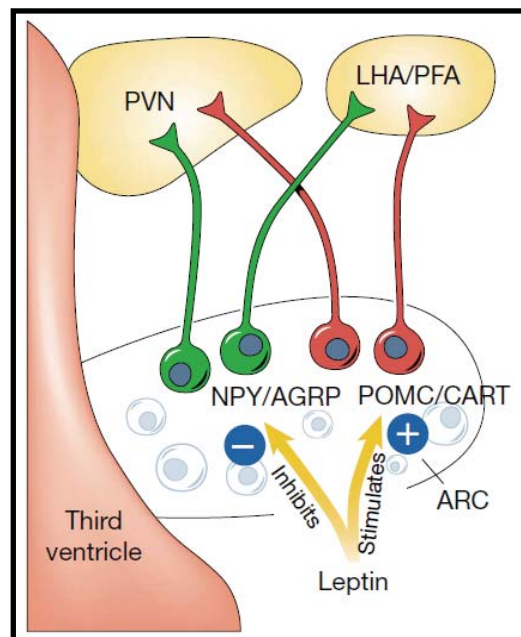


Figura 2. Les poblacions neuronals de primer ordre NPY/AgRP (en verd) i POMC/CART (en vermell) del nucli arcuat estan regulades per la leptina i es projecten cap a PVN, LHA i PFA, on es localitzen les neurones de segon ordre involucrades en la regulació de la ingesta i la despesa energètica [30].

2.2 DESPESA ENERGÈTICA

A l'altra banda de la balança energètica es situa la despesa energètica, que té una importància en el manteniment del pes corporal comparable a la ingesta, esdevenint la combinació dels dos factors el que, finalment, determinarà el pes corporal dels individus, i per tant el grau d'obesitat. Evidències experimentals posen de manifest la importància de la regulació de la despesa energètica en el control del pes corporal. En aquest sentit, diversos models experimentals obesos presenten taxes de despesa energètica marcadament disminuïda [92]. D'altra banda, els estudis realitzats en humans també suggereixen que el desenvolupament de l'obesitat és conseqüència, en part, a deficiències en aquest paràmetre [93, 94].

La despesa energètica es pot dividir en dos components bàsics:

- L'activitat física.

- La termogènesi, subdividida entre la termogènesi obligatòria, producte de tots aquells processos essencials per a la cèl·lula i els teixits, i la termogènesi adaptativa, referida a les alteracions en la dissipació de calor en resposta a canvis ambientals, de l'estat nutricional, infeccions i a diverses drogues o aliments.

L'activitat física

L'activitat física és un procés regulable per l'individu, i la seva incidència sobre la despesa energètica ens és fàcilment comprensible. No obstant, hi ha consideracions a tenir en compte en el tractament de l'obesitat mitjançant l'activitat física: la més important és l'increment dels senyals orexigènics que, actuant com a resposta compensatòria del balanç energètic en front a l'augment de la demanda energètica, causen un increment en la ingesta [94].

Hem de tenir en compte, però, que l'increment de l'activitat física en el tractament de l'obesitat no sempre és suficient per resoldre el problema, i per això cal actuar sobre altres mecanismes reguladors de la despesa energètica.

La termogènesi

Quan l'organisme es troba en repòs no es realitza cap treball sobre el medi, i aleshores la despesa energètica és causada exclusivament per la calor produïda, o termogènesi, i tots els processos que tenen lloc en aquest moment s'anomenen processos termogènics [95].

La termogènesi està relacionada amb la fosforilació oxidativa que té lloc en la matriu mitocondrial. Fruit de la glicòlisis i de la β -oxidació d'àcids grassos, el cicle de l'àcid cítric genera un potencial reductor en forma de NADH i FADH₂. Aquestes molècules, en oxidar-se, cedeixen electrons a la cadena de transport electrònic de la membrana mitocondrial interna (cedint l'àtom d'oxigen per formar aigua) i així

generen un gradient electroquímic de protons entre l'espai intermembrana i la matriu mitocondrial. Aquest gradient o força protomotriu, proveeix l'energia necessària per la síntesi d'ATP mitjançant la reentrada de protons a la matriu mitocondrial a través de la F_0F_1 -ATP sintasa. Aquest procés s'anomena fosforilació oxidativa acoblada. No obstant hi ha altres mecanismes que no fan servir la F_0F_1 -ATP sintasa per permetre el reflux de protons a la matriu mitocondrial, aquests mecanismes es denominen desacoblament mitocondrial [95, 96], i n'hi ha de dos tipus:

- **Desacoblament mitjançat per proteïnes:** El consum del gradient de protons es fa mitjançant una via proteica, com és el cas de les UCPs (*Uncoupling protein*) o els transportadors glutamat/aspartat.
- **Desacoblament no mitjançat per proteïnes o *proton leak*:** En aquest cas el gradient de protons es consumeix via porus de membrana no proteics. Aquest fenomen és constitutiu de tots els teixits del cos i contribueix significativament a la taxa metabòlica basal [97].

Si ens fixem amb la funció realitzada pels processos termogènics, els podem classificar en dos tipus diferents:

- **La termogènesi obligatòria:** És el resultat de dos processos diferents, la calor despesa per l'organisme en repòs, producte dels processos indispensables pel manteniment de les estructures i les funcions cel·lular i dels diferents òrgans, i el *proton leak* [97].
- **La termogènesi adaptativa o facultativa:** És la calor produïda per sobre del nivell basal. El mecanisme generador de calor s'activa en resposta a la temperatura ambiental, a la dieta o a processos febrils, per la protecció de l'organisme en front l'exposició al fred, a infeccions [98] o la regulació de desequilibris energètics després de canvis en la dieta [99]. Aquest tipus de

termogènesi es divideix en dos subtipus, la termogènesi amb tremolor (treball muscular), o sense tremolor (la realitzada pel teixit adipós marró i les UCPs).

3.- LEPTINA: HORMONA REGULADORA DE L'HOMEÒSTASI ENERGÈTICA

3.1 LA LEPTINA

Els treballs relacionats amb l'existència d'un sistema fisiològic regulador del pes corporal, de l'alimentació i de la despesa energètica es van iniciar aproximadament fa quatre dècades. El fet que en la majoria dels mamífers l'adipositat presenti una tendència a mantenir-se constant durant llargs períodes de temps va fer sospitar de l'existència d'algun mecanisme homeostàtic capaç de regular les variacions en el balanç energètic en funció dels requeriments energètics de cada moment. Aquesta hipòtesi es va veure reforçada per les observacions experimentals descrites per Harris, en què veia que després d'una disminució important de l'adipositat causada per dietes hipocalòriques o intervencions quirúrgiques, el pes corporal es restaurava en un període de temps relativament curt si no hi havia limitacions a l'accés al menjar [100]. Les observacions clàssiques de Hetherington i Ransom [44] i les de Hervey [101], suggerien que el sistema regulador proposat havia d'estar relacionat amb l'hipotàlem, ja que les rates amb lesions en l'àrea ventromedial del cervell desenvolupaven obesitat, a més d'increments en la ingesta. D'altra banda, si a rates control se'ls injectava la sang dels animals amb aquestes lesions (circulació creuada), perdien la gana completament i morien d'inanició. Aquests fets demostraven l'existència d'un factor circulat que estava elevat en animals amb lesions hipotalàmiques i que produïa el descens de la ingesta en animals sans. Altres investigacions relacionades amb el concepte de "factor de sacietat circulat" van donar lloc al descobriment de dues mutacions en ratolí, denominades *ob* (per *obese*) i *db* (per *diabetes*) responsables de produir alteracions com obesitat, hiperfàgia, hiperinsulinèmia, hiperglicèmia, reducció de la despesa energètica, hipogonadisme i infertilitat [102]. Quan els ratolins *ob/ob* eren sotmesos a una circulació creuada a partir de ratolins normals, aquests

recuperaven les característiques energètiques dels ratolins control. En canvi, el mateix procediment entre ratolins *db/db* i ratolins controls, provocava una severa hipofàgia dels animals controls. Aquestes observacions van permetre a Coleman a la dècada dels 70 concloure que els ratolins *ob/ob* no produïen un “factor de sacietat humoral” i que els ratolins *db/db* no sintetitzaven el producte addicional necessari per respondre a aquest factor [103, 104]. Finalment, el gen responsable de la mutació *ob* va ser descrit tant en ratolí com en humans al 1994 per Zhang [34], i el producte de gen *ob* es va denominar leptina, del grec *leptos* o prim. Aquesta descoberta va obrir un nou camp de perspectives en l'estudi del rol de les diverses adipocitocines en el control del balanç energètic [105-107].

La leptina és un polipèptid produït i secretat al sistema circulatori principalment pels adipòcits del teixit adipós blanc. No obstant, aquest no és l'únic teixit capaç de produir l'hormona: la placenta, la mucosa gàstrica, la medul·la, l'epiteli mamari, el teixit adipós marró, el múscul esquelètic, la glàndula pituïtària, l'hipotàlem i l'os, també són teixits que en certes circumstàncies tenen capacitat productora de leptina, tot i que en quantitats molt inferiors al teixit adipós blanc [108-111].

La leptina es produeix a partir d'un precursor de 167 aminoàcids, amb una seqüència senyal de 21 aminoàcids que s'escindeix abans que la leptina es secreti al torrent circulatori, donant lloc a la forma activa de 146 aminoàcids i d'un pes molecular de 16 KDa. Mitjançant tècniques de determinació de l'estructura cristal·lina i de ressonància magnètica nuclear s'han observat similituds estructurals amb diversos membres de la família de les citocines helicoïdals de cadena llarga com, entre d'altres, la CT-1 (cardiotropina-1) i les interleucines IL-6, IL-11 i IL-12, així com un plegament similar al de la subfamília de les citocines de cadena curta [112-114]. L'estructura tridimensional de la forma activa de la molècula està composta per quatre hèlix α antiparal·leles amb tres girs α , a més d'un pont disulfur entre dos residus de cisteïna (C96 i C144) [34, 115, 116]. Així doncs, a partir de la seva estructura podem classificar la leptina com a citocina de classe I. El caràcter de citocina de la leptina es veu reflexat per les seves accions pleiotròpiques i l'expressió ubiqüa del seu receptor [117].

La seva estructura és molt similar entre les diferents espècies: la leptina humana presenta un 84 % d'homologia amb la leptina murina i un 83% amb la de rata [34]. Les concentracions de leptina circulants es correlacionen amb el BMI i amb el total de greix acumulat [105, 115, 118]. El temps de vida mitja de la leptina circulant és força curt a causa de l'elevada eficiència del procés de depuració renal que es du a terme per un mecanisme d'alta capacitat no saturable, consistent en una filtració glomerular de la leptina lliure, seguida d'una degradació metabòlica efectuada en els túbuls renals [119, 120]. No obstant, en humans, aquesta leptina circulant ho fa majoritàriament unida a macromolècules del sèrum que modulen la bioactivitat i la biodisponibilitat de l'hormona. Aproximadament un 10% d'aquestes macromolècules que s'uneixen a la leptina són la forma soluble del seu receptor, i la resta estan formades per proteïnes d'entre 280KDa i 80KDa [121].

El ràtio de leptina lliure respecte a la forma unida a macromolècules està augmentat en el sèrum d'individus obesos (aproximadament el doble que en els individus primos), i això suggereix que aquesta leptina, en estar lliure, serà bioactiva i això és el que podria donar lloc a una resistència a la leptina (veure apartat 4.5, *La resistència a la leptina*). En els subjectes primos amb relativament poc teixit adipós, la majoria de la leptina circulant es troba en forma unida, i per tant no estarà disponible pels receptors del cervell, evitant així el resultat d'una resistència a la hormona [121, 122].

A part de la seva acció central com a reguladora de la ingesta i la despesa energètica a l'hipotàlem, la leptina també està involucrada en altres processos fisiològics (figura 3). Uns nivells adequats de leptina són necessaris per la reproducció, l'angiogènesi, la cicatrització, l'hematopoiesi, el desenvolupament dels ossos i l'activació del sistema immunològic [48, 123, 124]. La leptina també regula l'homeòstasi de la glucosa i el metabolisme dels lípids de forma independent a la seva acció central, parcialment per via directa en les cèl·lules β pancreàtiques i hepatòcits [125].

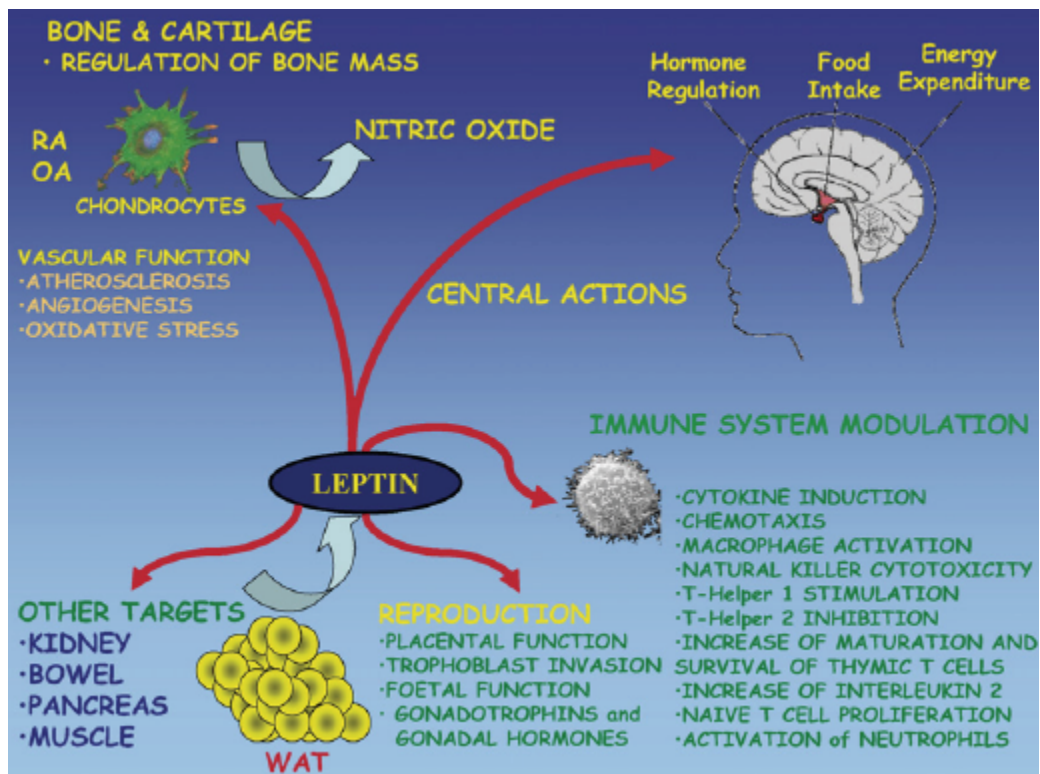


Figura 3. Representació esquemàtica del paper pleiotròpic de la leptina [126].

3.2 ELS RECEPTORS DE LA LEPTINA

La leptina exerceix els seus efectes unint-se al seu receptor, localitzat en diferents teixits del cos. El receptor de la leptina presenta una alta homologia amb la subunitat gp130 del receptor IL-6, i és un membre de l'extensa família de receptors de citocines de classe I [127, 128].

Els receptors de leptina humans i murins són molt similars en quant a la seqüència aminoacídica, tant pel domini extracel·lular (78% d'homologia) com per l'intracel·lular (71% d'homologia) [16].

Existeixen com a mínim sis isoformes de receptor, Ob-R(a-f), les quals són productes d'un únic gen, *Lepr*, i són el resultat de l'*splicing* alternatiu i/o processament proteolític [16, 129-131].

Els receptors de la leptina (Ob-R) es poden classificar com a secretats o solubles (Ob-Re) (única forma del receptor sense domini transmembrana ni domini intracel·lular), de forma curta (Ob-Ra,c,d i f), i de forma llarga (Ob-Rb) (figura 4). Totes

les formes murines d'Ob-R (excepte Ob-Re) presenten una part extracel·lular idèntica, un domini d'unió a lligand de 816 aminoàcids, i un domini intracel·lular C-terminal que és diferent segons cada forma de receptor [16, 127, 129, 131, 132]. Ob-Rb té un llarg domini intracel·lular, d'aproximadament 320 aminoàcids, amb diferents motius (Box 1, Box 2, i tres residus tirosina en les posicions Y985, Y1077 i Y1138) requerits per la plena activació de la via de senyalització JAK/STAT [16, 128]. Les isoformes curtes del receptor només tenen un domini intracel·lular de menys de 50 aminoàcids, contenint únicament el box 1 i 2. Donada la falta de la part del domini intracel·lular encarregada de la senyalització, totes les isoformes curtes de Ob-R es consideren no capaces de transmetre el senyal intracel·lular [128].

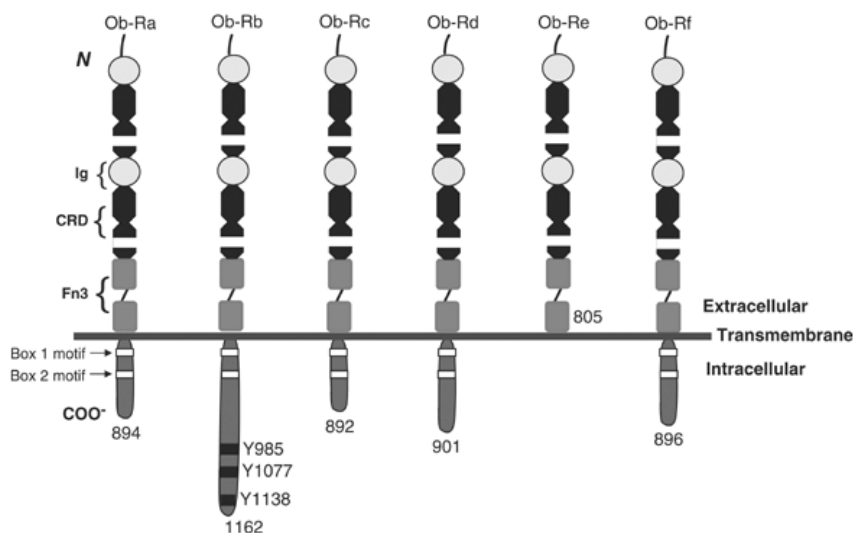


Figura 4. Isoformes del receptor de la leptina [128].

L'expressió d'Ob-R es pot detectar en múltiples teixits. En els ratolins, els majors nivells d'aquesta proteïna es detecten a plexe coroid, pulmons, fetge, teixit adipós i pàncrees, tot i que també se'n detecten nivells més baixos a pràcticament tots els teixits [127, 133, 134]. No obstant, estudis posteriors van mostrar que la gran majoria dels trànscripats detectats codificaven només per les formes curtes del receptor [134]. En general, els teixits perifèrics expressen 10 vegades més mRNA codificant per les formes curtes que per la llarga [134, 135]. En els teixits de ratolí, l'abundància

relativa de la forma llarga (Ob-Rb) expressada com a percentatge total de mRNA respecte Ob-R és: estómac (11%), intestí prim (7%), pàncrees (11%), múscul esquelètic (8%), teixit adipós (6%), fetge (5%), cor (10%) i hipotàlem (36%) [134, 135]. A l'hipotàlem, la forma llarga del transcrit es detecta sobretot al nucli arcuat, nucli paraventricular, hipotàlem ventromedial i dorsomedial, regions implicades en la regulació del pes corporal [136].

La funció precisa de les isoformes curtes del receptor (Ob-Rs) no està clara. La possibilitat més acceptada és que l'expressió d'Ob-Rs reguli el transport de la leptina en la sang, dirigint-la cap al líquid cefaloraquídi [137].

El paper del domini intracel·lular curt del receptor de la leptina encara no està ben definit. Sembla que els alts nivells d'expressió d'aquesta forma curta al plexe coroideu juguen un paper en el transport de la leptina des de la sang al líquid cefaloraquídi (LCR), on podrà moure's per difusió al cervell. S'ha vist que la leptina entra al cervell mitjançant un mecanisme de transport saturable específic, tot i que un rol crític dels Ob-Rs en aquest procés no està demostrat [16].

El motiu del fet que existeixin diferents formes de receptor curt no està clar. Les formes curtes tenen clarament diferent distribució en els teixits, no obstant, no sembla provable que hi hagi diferències funcionals entre aquestes formes [16, 138].

3.3 VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA LEPTINA

A nivell general, quan la leptina s'uneix a la forma llarga del receptor, aquest dimeritza i permet que s'hi uneixi la proteïna JAK (*janus kinase*). JAK és la responsable de les fosforilacions en tirosines del receptor, permetent-hi la unió de STAT (*signal transducer and activator of transcription*) i la seva activació per fosforilació en el seu residu tirosina. La forma fosforilada de STAT dimeritza i es transloca a nucli, on s'uneix al DNA i així regula la transcripció gènica [139-141] (Figura 5).

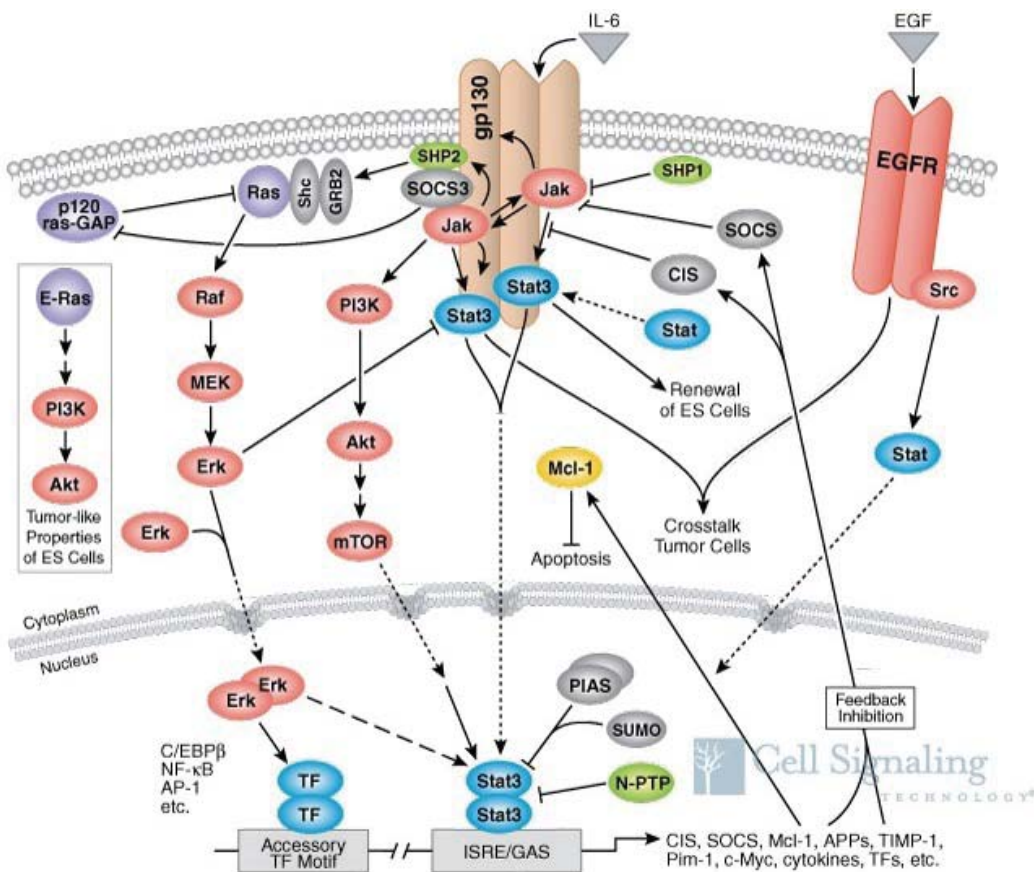


Figura 5. Via de senyalització de la leptina (Cell Signaling, www.cellsignal.com)

A continuació es descriu la via de senyalització de la leptina amb més detall.

Proteïna JAK2

A l'hipotèlem, on s'ha descrit més exhaustivament aquesta via de senyalització, Ob-Rb en resposta a la leptina dimeritzada i permet la unió de JAK2 al box-1 i box-2 [142]. Durant el procés d'unió al receptor, JAK2 s'activa per autofosforilació en múltiples residus de tirosina i promou la fosforilació dels dos residus Y^{985} i Y^{1138} del receptor [142-144] (figura 6). La fosforilació del residu Y^{985} promou la unió de la tirosina fosfatasa SHP-2, que causa l'activació d'ERK 1/2 (*extracellular signal regulated kinase*) via p21RAS. Tot i que la major part de l'activació de ERK 1/2 és dependent de Y^{985} , hi ha

una part regulada amb independència del receptor, causada per l'acció directa del propi JAK2 [143, 145], com s'explicarà amb més detall a continuació.

Activació de STAT3

Les dianes moleculars de JAK2 més estudiades i conegudes són els membres de la família STAT. La fosforilació de Y¹¹³⁸ del receptor promou la unió de STAT3 al complex Ob-Rb/JAK2, provocant la fosforilació en el seu residu tirosina Y⁷⁰⁵ i la seva dimerització. Un cop fosforilada en tirosina i dimeritzada, la proteïna STAT3 es transloca al nucli, on s'unirà al DNA per actuar com a factor de transcripció [138, 146].

A més de la fosforilació en Y⁷⁰⁵, la fosforilació en el residu serina S⁷²⁷ en el domini d'activació sembla ser necessària per una completa activitat transcripcional de STAT3, com a mínim en alguns sistemes, i s'ha vist que té importància biològica gràcies a cèl·lules mutants on es reemplaçava la Ser-727 per Ala-727 [147].

La fosforilació S⁷²⁷ està directament controlada per l'acció de ERK 1/2 [147, 148], i la seva activitat és complexa: si es dona de forma ràpida, abans que STAT3 s'hagi fosforilat en Y⁷⁰⁵, podrà impedir o dificultar la fosforilació en tirosina, i per tant bloquejar la seva acció com a factor de transcripció (impedint que dimeritzi i es transloqui a nucli), mentre que si la fosforilació en serina és dona de forma retardada, quan STAT3 ja es troba fosforilat en tirosina, la seva acció serà la de potenciar la seva activitat [149, 150] (figura 5). En estudis on s'ha bloquejat la fosforilació en serina de STAT3 s'ha vist que l'activitat d'aquesta proteïna com a factor de transcripció és només del 20% [147].

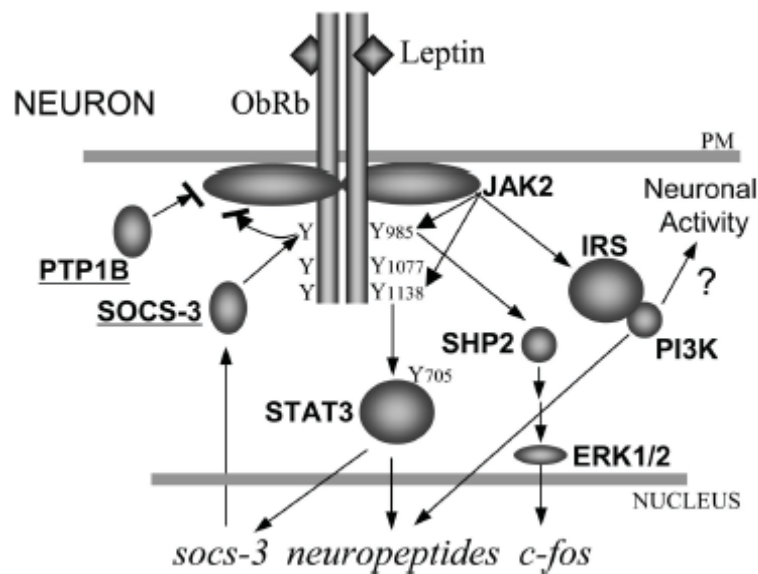


Figura 6. Esquema de la via de senyalització de la leptina en neurones hipotalàmiques [133].

Activació de la via ERK

Com moltes altres citocines, la leptina activa la via $RAS \rightarrow RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK$ [143, 151, 152]. Tot i que la cadena sencera de reaccions que donen lloc a l'activació de ERK1 i ERK2 no es coneix del tot, tot sembla indicar que Ob-Rb seguiria la mateixa via d'activació que els receptors IL-6 [153]. La fosforilació del residu Tyr985 del receptor de la leptina crea un lloc d'unió pel domini SH-2 de la tirosin-fosfatasa SHP-2 [154] (figura 6). SHP-2 es fosforila en la seva tirosina c-terminal, la qual reclutarà la proteïna adaptadora GRB2 (proteïna d'unió al factor de creixement-2) cap al complex del receptor [143]. En la via canònica d'ERK 1/2, GRB2 forma complex amb SOS, el factor d'intercanvi GTP per RAS, i s'activa la via $RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK$, en què cada cinasa activarà la cinasa següent mitjançant fosforilacions.

La leptina, tot i que en nivells molt baixos, també pot induir l'activació d'ERK 1/2 per vies independents a Tyr985 i SHP-2, segurament per mitjà de la unió directa de GRB2 a JAK2 [143].

Dins el grup de tots els efectes d'ERK 1/2, l'increment d'expressió de gens primerencs com cFOS s'ha demostrat en cultius cel·lulars i *in vivo* a hipotàlem [63, 155]. L'estudi del ratolí knock-in *Lepr*^{s1138/s1138} (veure apartat 4.6, *Models animals*

deficients en la senyalització de la leptina) demostra que la regulació de *c-fos* no és dependent de l'activació de STAT3 [156], sinó d'ERK 1/2. No està clar com es tradueix l'activació de c-Fos via ERK 1/2 en els efectes fisiològics de la leptina, però l'increment d'expressió de cFos és un marcador d'activitat neuronal [63].

La fosfatasa SOCS3

STAT3 activa la transcripció de la fosfatasa SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), donant lloc a una inhibició del tipus *feedback* negatiu [139, 143, 157]. SOCS3 s'uneix a Y⁹⁸⁵ del Ob-Rb per inhibir la senyalització de STAT3 [158], i també s'uneix de forma independent a JAK2 [159, 160] per inhibir la seva senyalització (figura 6). La importància de la unió de SOCS3 en aquests dos llocs, al igual que la via de senyalització Y¹¹³⁸-STAT3 per la generació del supressor, està desembocant en un interessant àrea d'investigació científica, evidenciant la importància d'aquesta regió del receptor per regular la senyalització de la leptina, així com la resistència a l'hormona [158, 159, 161, 162].

Altres vies activades per la leptina

Tot i que no són objecte d'estudi en aquesta tesi, cal esmentar que la leptina també activa altres vies, com la d'IRS (Substrat del receptor de la insulina), Pi3K (Fosfoinosítide 3-cinasa), AMPK (Proteïna cinasa d'activació AMP) i mTOR (Diana de rapamicina de mamífer) de forma independent de STAT3 [151, 156, 163-165].

Regulació gènica per part de la leptina

Ob-Rb també mitjança nombroses accions *downstream*: l'activació del receptor per part de la leptina promou la regulació de la transcripció d'importants missatgers

com cFos, SOCS3 i els neuropèptids NPY/AgRP (transcripció inhibida per la leptina), i CART/POMC (transcripció activada per la leptina), entre d'altres [117].

El fet que hi hagi d'haver una senyalització activa de STAT3 per tal d'observar els efectes de la leptina sobre el pes corporal fa pensar que potser els gens diana de STAT3 són importants pel control de l'homeòstasi energètica (figura 6). Se sap que la leptina incrementa la transcripció de *Pomc* en poblacions neuronals hipotalàmiques [166]. L'expressió gènica de *Pomc* està directament induïda per la leptina a través d'un element de resposta a STAT3 en el seu promotor, tan *in vitro* com *in vivo* (figura 7) [167]. Es va observar, però, que la inactivació genètica de STAT3 en neurones POMC, tot i que efectivament reduïa els nivells d'aquest missatger, només causava obesitat lleu i no abolia completament l'efecte anorexigènic de la leptina, indicant que els efectes dependents de STAT3 sobre la regulació de POMC en altres cèl·lules també hi ha d'estar implicats [168].

Ratolins amb la senyalització Ob-Rb/STAT3 trencada (ratolí *Lep^r^{s1138/s1138}*) de forma selectiva a hipotàlem no només tenen nivells de mRNA de POMC reduïts, sinó que també mostren un increment dels nivells d'expressió de AgRP, manifestant hiperfàgia i obesitat, i confirmant que STAT3 també és requerit per la regulació del neuropèptid AgRP. Tot i que efectivament els nivells de AgRP es veuen incrementats, segueixen sent menors que en els ratolins *db/db*, model animal sense receptor de la leptina (veure apartat 4.6, *Models animals deficients en la senyalització de la leptina*), i això podria indicar que AgRP està regulat per mecanismes dependents i independents de STAT3. A més, a diferència dels ratolins *db/db*, els ratolins amb la via Ob-Rb/STAT3 trencada no mostren nivells elevats de mRNA de NPY. La discordança en els mecanismes moleculars de regulació dels nivells hipotalàmics de missatger de NPY i AgRP és curiosa, ja que els dos pèptids es co-expressen en les mateixes cèl·lules i són controlats en paral·lel per la leptina i l'estat nutricional en els ratolins control. Tot això suggereix que mentre que la senyalització Ob-Rb/STAT3 és requerida per l'estimulació de POMC i la plena repressió de la transcripció de AgRP, la inhibició de NPY per part de la leptina estaria mitjançada per una senyalització diferent [139], i la opció més recolzada és la via Pi3K [169, 170]. En estudis on s'injectava l'inhibidor de Pi3K a

ratolins via ICV es va observar una incapacitat per part de la leptina per reduir els nivells de NPY i AgRP, els quals eren iguals a les rates control dejunades [170].

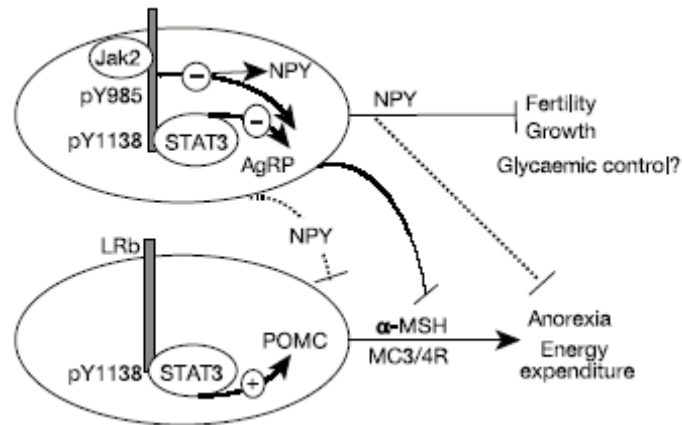


Figura 7. Model de senyalització del receptor de la leptina en el control dels nivells de neuropèptids i la fisiologia del nucli arcuat. La leptina incrementa els nivells de POMC via STAT3, generant un senyal anorèctic positiu a través de α -MSH i dels receptors de melanocortina MC3 i MC4. En les neurones NPY/AgRP, la leptina inhibeix la producció d'AgRP en part via la senyalització Ob-Rb/STAT3, i potenciant la senyalització de la melanocortina. Elevats nivells de NPY inhibeixen el creixement i la fertilitat, i podrien influenciar també en el control del metabolisme de la glucosa. NPY també bloqueja un component de la funció anorèctica de la leptina (línia discontinua) de forma directa o a través d'una regulació creuada (*cross-talk*) del sistema melanocortinèrgic. La inhibició de NPY a partir de Ob-Rb és de forma independent a STAT3 [139].

3.4 EFECTES PERIFÈRICS DE LA LEPTINA

A més dels efectes centrals, la leptina també té efectes a nivell exclusivament perifèric, com per exemple la seva acció sobre el sistema immunològic (que és resultat d'un efecte directe sobre les cèl·lules T que expressen el Ob-Rb [171]), o la regulació de l'homeòstasi de la glucosa independentment dels efectes sobre l'adipositat (que s'aconsegueix en part per una regulació central, però també per la regulació directa de teixits participants en el metabolisme de la glucosa [172, 173]). Altres efectes perifèrics de la leptina són l'estimulació de la lipòlisi en teixit adipós i en múscul [103], la inhibició de la lipogènesi, la inhibició de la secreció de la insulina [174], efectes sobre la funció respiratòria, la reproducció, el control del creixement i el desenvolupament [175-177] (figura 3).

3.5 LA RESISTÈNCIA A LA LEPTINA

Un absolut dèficit de leptina no explica la gran majoria de casos d'obesitat: és més, la majoria dels individus obesos mostren elevats nivells de leptina circulants [178-180]. Pensar en per què aquests elevats nivells de leptina no actuen disminuint la ingesta i així prevenir l'obesitat va donar lloc a la idea que potser existia una resistència fisiològica a la leptina.

S'han descrit diferents mecanismes per explicar aquesta resistència. Les opcions més recolzades són les alteracions en el transport de la leptina a través de la barrera hematoencefàlica (una incapacitat de la leptina per contactar amb el seu receptor al cervell: resistència a l'administració perifèrica de la leptina), i alteracions en la senyalització a partir del receptor de la leptina (un deteriorament de la resposta cel·lular a l'hormona per part de les neurones: resistència central a la leptina) [105, 157, 181, 182]. Les dades recollides fins avui confirmen que les alteracions en la senyalització cel·lular del receptor de la leptina, sobretot a nivell d'ARC, juguen un paper fonamental en la resistència a la leptina [157, 182, 183].

Resistència a l'administració perifèrica de la leptina

Una forma de resistència a la leptina és l'associada amb el transport defectiu d'aquesta hormona en sèrum a través de la barrera hematoencefàlica [184], fent que el ràtio de leptina en líquid cefaloraquídi (LCR) estigui disminuït. Aquesta resistència a l'administració perifèrica de leptina és característica de l'obesitat induïda per dieta, i es dóna relativament aviat després de l'inici de la dieta rica en greixos, mentre els animals encara són responedors a l'administració de leptina per via central [185, 186]. El mecanisme podria involucrar la interferència per part dels elevats nivells de triglicèrids amb el transport de la leptina a través de la barrera hematoencefàlica, resultant en uns nivells de leptina insuficients al cervell [187].

Resistència central a la leptina

Aquest concepte de resistència a la leptina és anàleg al de la insulina, on es requereixen elevats nivells d'insulina per mitjançar una disponibilitat de glucosa adequada i un bon control metabòlic.

Aquesta forma de resistència està associada al truncament de la senyalització de la leptina a regions específiques del cervell. Els mecanismes moleculars que contribueixen a aquesta resistència cel·lular i a aquesta senyalització defectuosa podrien incloure l'existència d'elevats nivells de SOCS3 o de la seva activitat [188].

SOCS3 s'uneix a Tyr⁹⁸⁵ del receptor de la leptina i a JAK2 per bloquejar (i així modular) la resposta del receptor [158]. Manipulant ratolins per tal d'aconseguir una disminució de l'expressió de SOCS3 a nivell neuronal s'ha vist que aquests animals incrementen àmpliament la senyalització de la leptina, resultant en animals més primers que els control, a més de ser resistents a l'obesitat induïda per dieta [161]. La Tyr⁹⁸⁵ del receptor també mitjança l'atenuació de la senyalització de Ob-Rb en cultius cel·lulars, i la mutació d'aquest residu en els ratolins // resulta en una sensibilitat a la leptina incrementada, són animals més primers i no desenvolupen resistència a la leptina [154, 155, 158].

3.6 MODELS ANIMALS DEFICIENTS EN LA SENYALITZACIÓ DE LA LEPTINA

Els models animals esdevenen una eina essencial per a molts estudis diferents. En el cas de l'estudi de la leptina i la seva senyalització existeixen diferents models interessants, cadascun d'ells amb determinades característiques útils per a l'abordatge d'objectius concrets. La seva utilització permet aprofundir en el coneixement de diferents aspectes de la via de senyalització de la leptina.

Rata Zucker (*fa/fa*): Aquest model ha esdevingut el més popular per a l'estudi de diversos aspectes de l'obesitat en rata. Aquest model animal presenta un conjunt d'anomalies causades per una mutació en el gen *fa* que codifica per la forma llarga del

receptor de la leptina [189]. Fenotípicament es caracteritza per presentar hiperfàgia, aparició prematura d'obesitat, termogènesi alterada, resistència a la insulina i hiperlipèmia sense alteracions en la glicèmia.

Rata Koletsky (fa^k/fa^k): Aquest model experimental, és força similar a la rata Zucker fa/fa , i presenta un fenotip pràcticament indistingible. La diferència entre ambdós models radica en la mutació del gen fa , essent en el cas de la rata Koletsky, causant de la deficiència de tots els subtipus de receptors de leptina, mentre que la rata Zucker únicament presenta deficiències en la isoforma llarga del receptor [190, 191].

Ratolí ob/ob : Aquests ratolins presenten una mutació autosòmica recessiva en el gen ob , la qual provoca perturbacions neuroendocrines que els confereix una capacitat de conversió de l'energia en greix inusualment eficient. Al 1994 es va veure que aquesta mutació corresponia al gen de la leptina [192]. En els ratolins homozigots, aquesta mutació produeix obesitat, resistència a la insulina a nivell hepàtic i muscular a partir de la quarta setmana d'edat, i hiperglicèmia transitòria entre la vuitena i dotzena setmana, que es reverteix a conseqüència d'una hiperplàsia i hipertròfia compensatòria de la cèl·lula β pancreàtica entre les setmanes dotze i setze [193]. A més, presenten intolerància a la glucosa, infertilitat, defectes en la regulació de la temperatura corporal, hiperfàgia i desregulació en el metabolisme de la glucosa. Els ratolins heterozigots $ob/+$ no desenvolupen aquestes anomalies.

Ratolí db/db : la mutació db (*diabetes*), de caràcter autosòmic recessiu provoca, com a resultat final, el truncament de la isoforma llarga del receptor de la leptina [194]. Aquesta alteració evita la transducció correcta del senyal a través d'aquest receptor. El fenotip del ratolí db/db es caracteritza per hiperfàgia, aparició prematura d'obesitat, resistència a la insulina i hiperleptinèmia. La severitat d'aquestes alteracions estan determinades pel *background* genètic de la soca en qüestió [131].

Ratolí db^{3j}/db^{3j} : Aquest ratolí presenta, de la mateixa forma que la rata Koletsky, la deficiència de tots els subtipus de receptors de la leptina [195], i estableix la mateixa relació amb els ratolins db/db , que la rata Koletsky amb la rata Zucker fa/fa .

Ratolí $Lepr^{y985/y985}$ (I/I): Aquest ratolí presenta una mutació al receptor de la leptina, concretament a la tirosina 985, la qual s'ha reemplaçat per una leucina. Aquesta mutació anul·la la seva fosforilació i bloqueja el reclutament de SHP-2/SOCS3. Aquests animals presenten una ingesta i una adipositat reduïdes, una expressió de neuropèptids orexigènics disminuïda en ARC i una activació basal de STAT3 augmentada. També mostren una sensibilitat a la leptina exògena major. Aquests animals no són fèrtils [155].

Ratolí $Lepr^{s1138/s1138}$ (s/s): Aquest ratolí presenta una mutació al receptor de la leptina, concretament a la tirosina 1138, la qual s'ha reemplaçat per una serina. Aquesta mutació trenca específicament la senyalització leptina-STAT3, donant lloc a un fenotip hiperfàgic i obès. Els nivells de neuropèptid NPY són normals, i els animals són perfectament fèrtils [139].

4.- PLASTICITAT NEURONAL I LEPTINA

Fa temps que se sap que les hormones circulants, així com els esteroides adrenals, esteroides sexuals i l'hormona tioridea juguen un paper important en el desenvolupament del cervell [196-198].

Les hormones circulants que actuen al cervell, com la leptina, representen senyals importants que reflecteixen l'estat energètic perifèric, i influeixen en el desenvolupament dels mecanismes centrals que regulen la ingesta i el pes corporal [199]. Es va observar que animals predisposats genèticament a patir obesitat induïda per dieta (DIO), els quals són resistents a la leptina, tenen projeccions ARC defectuoses, i es mantenen defectuoses al llarg de tota la vida de l'animal [100]. En aquests animals no s'observen canvis en el número de cèl·lules ni en el patró de la

distribució neuronal, indicant que el genotip DIO només afecta l'extensió neuronal [199-201].

4.1 DESENVOLUPAMENT DE LES PROJECCIONS NEURONALS DES D'ARC

Existeixen diferències fisiològiques en la regulació del balanç energètic entre adults i nounats. En contrast als efectes de la leptina en adults, la leptina exògena administrada durant les 2-3 primeres setmanes de vida no inhibeix la ingesta o la despesa energètica [202-204]. De fet, la leptina no altera el consum d'oxigen (marcador de despesa energètica) o la ingesta en ratolins control o *ob/ob* fins al dia 17 després del naixement (postnatal 17 o P17) [204]. D'acord amb aquesta dada, ratolins *ob/ob* nounats no difereixen en pes corporal amb ratolins control, no comencen a divergir en pes fins a la segona setmana després de néixer [204]. S'ha cregut durant molt de temps que això era degut a una resistència a la leptina a nivell cerebral, però recentment s'ha vist que no és així: existeix el receptor de la leptina en rates [205] i ratolins [206] abans del desenvolupament de les vies de senyalització d'ARC, i aquest receptor dona lloc a respostes cel·lulars des del mateix moment de néixer, ja que si s'injecta leptina en rates postnatales, es modifica l'expressió de mRNA de NPY i AgRP a ARC [203].

Les projeccions neuronals d'ARC són immadures en el moment de néixer. En ratolins, es desenvolupen sobretot a partir de la segona setmana de vida [207]. De fet, les projeccions d'ARC cap a altres nuclis clau en la mediació de la ingesta i el balanç energètic es desenvolupen en moments diferents: primer s'innerva DMH, a P6, seguit de la innervació de PVN a P8-P10 i la innervació de LHA a P12 (figura 8).

L'habilitat de la leptina circulant per activar les neurones d'ARC i les seves dianes en adults es coneix des que es va demostrar que injeccions perifèriques de l'hormona incrementaven l'expressió de c-Fos a ARC, DMH, PVN i LHA [63, 208, 209]. L'habilitat de la leptina per incrementar els nivells de c-Fos a PVN i LHA és depenent de l'edat, i es correlaciona amb l'arribada de les projeccions d'ARC a cada nucli.

L'administració de leptina a ratolins P6 eleva l'expressió de c-Fos només a ARC. No és fins a P10 que apareix c-Fos a PVN, o a P16 a LHA. Així, l'activació per leptina de les neurones a PVN i LHA només es dona quan les innervacions a partir d'ARC estan formades, mentre que c-Fos a ARC apareix des del mateix moment de néixer. Canvis significatius en els nivells de c-Fos representen activació hormonal de vies de transducció del senyal que donen lloc a canvis en l'expressió gènica, o activació transinàptica de vies de transducció del senyal similars [210, 211].

4.2 LA LEPTINA I EL DESENVOLUPAMENT DEL CERVELL

Durant el desenvolupament després del naixement, la ingesta s'ha de maximitzar per permetre el creixement, no obstant, els nivells de leptina en plasma en aquests moments de la vida són molt alts [212, 213]. Això va ser una troballa sorprenent, ja que en adults, la leptina suprimeix la ingesta. El fet que hi hagi un augment dels nivells de leptina circulant durant aquest període d'aparent insensibilitat a la leptina va suggerir que la leptina per si mateixa podria actuar com a senyal pel desenvolupament del cervell [212]. Els ratolins *ob/ob* i *db/db*, sense senyalització de la leptina, mostren una reducció del pes del cervell i defectes morfològics que donarien suport a aquesta hipòtesi [214-216]. Aquests mutants també tenen deficiències en l'expressió de proteïnes neuronals i gials [217, 218]. A més, estudis recents indiquen que el tractament de rates nounates amb leptina incrementa l'expressió de la proteïna 43 associada al creixement i a proteïnes sinàptiques com la sinaptofisina i la proteïna 25 associada al sinaptosoma en hipocamp [219]. Tenint en compte tot això, aquesta informació demostrava el paper de la leptina en el desenvolupament del cervell, i suggeria que un augment de la leptina postnatal podria servir com a senyal que promogué el desenvolupament de les projeccions des d'ARC. El fet que aquest increment de la leptina circulant (de P4 a P16) coincideixi amb el desenvolupament de les projeccions d'ARC dona suport a aquesta hipòtesi.

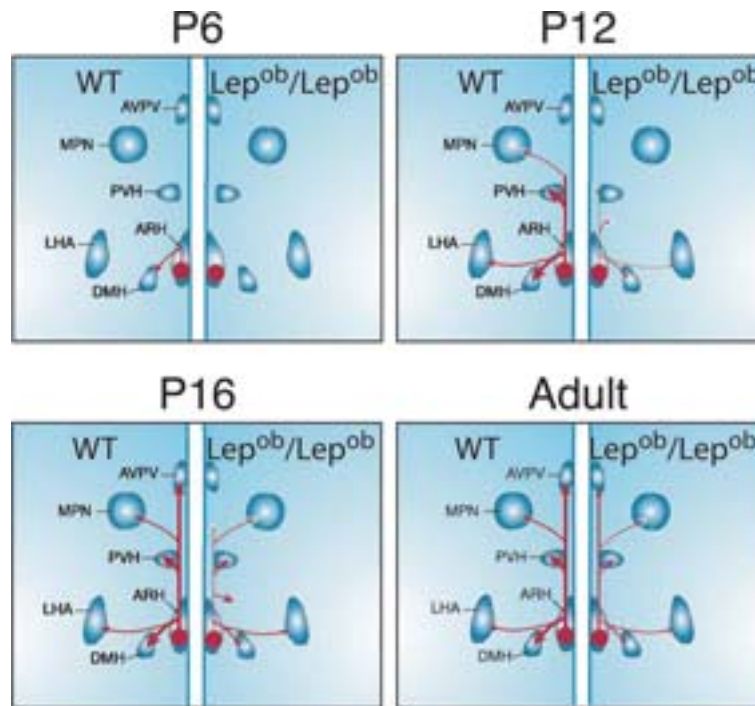


Figura 8. Diagrama esquemàtic que resumeix les projeccions d'ARC a través de l'hipotàlem en ratolins control (panells de l'esquerra) i ratolins *ob/ob* (panells de la dreta) en estadis de desenvolupament P6, P12, P16 i adults (P60). La deficiència de leptina afecta a la formació de projeccions des d'ARC cap a la majoria de nuclis diana [201].

4.3 LA LEPTINA PROMOU EL DESENVOLUPAMENT DE LES PROJECCIONS D'ARC

La tinció dels axons d'ARC va mostrar que les projeccions des d'aquest nucli eren severament reduïdes en els ratolins *ob/ob* (figura 8), i que la deficiència de leptina donava lloc a un retard significatiu en la formació de les projeccions des d'ARC cap als seus nuclis diana més importants [199]: en animals control, a P12 ARC ja innerva PVN, però en els ratolins *ob/ob* aquesta connexió no existeix. De fet, el trencament d'aquestes vies de senyalització d'ARC en ratolins *ob/ob* sembla ser permanent, ja que a P60 (estadi considerat com a madur, tenint en compte la regulació de l'homeòstasi energètica), surten molt poques fibres des d'ARC (figura 8) [201].

Els senyals hormonals que regulen el desenvolupament tendeixen a actuar estrictament durant períodes postnatsals crítics [220, 221]. La leptina funciona durant la vida del nounat per induir la formació de projeccions d'ARC: injeccions de leptina des de P4 fins a P12 en ratolins *ob/ob* van incrementar la densitat de fibres d'ARC innervant PVN fins a un nivell de densitat comparable als ratolins control [199]. Contràriament, el tractament de ratolins *ob/ob* adults amb leptina durant 20 dies (de P60 a P80) era inefectiu, ja que no restaurava la densitat de fibres en PVN. Per tant, l'activitat de la leptina en el desenvolupament de les projeccions d'ARC es restringeix al període postnatal, coincidint amb el moment en què hi ha un increment en la secreció de la leptina. Anant encara més enllà, Bouret et.al. va obtenir explants d'ARC de ratolí *ob/ob* nounat i els van cultivar en presència o no de leptina durant 72 hores. Van observar un increment significatiu de l'extensió de les neurites, fins a nivells comparables als de ratolins control, demostrant que la leptina promou l'elongació i proliferació dels axons (figura 9). Quan es va fer el mateix experiment a partir d'explants de ratolí *ob/ob* adult, aquests resultats no es van repetir [199]. Això va acabar de demostrar que l'acció de la leptina sobre el desenvolupament es restringeix al període postnatal.

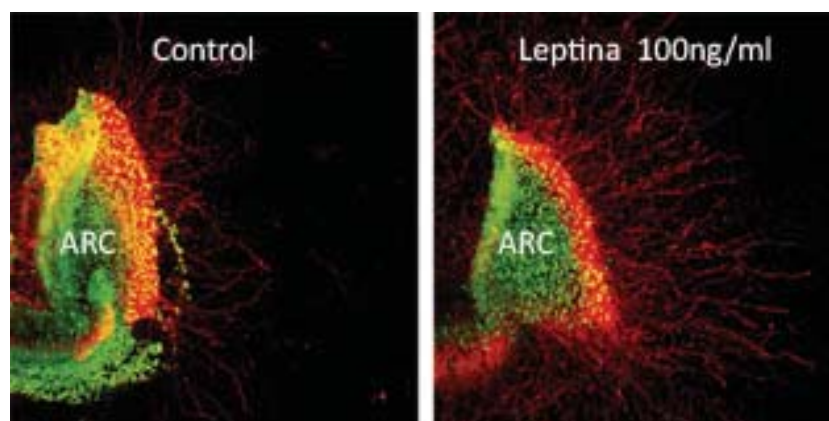


Figura 9. Explants d'ARC de ratolí *ob/ob* P6 en cultiu, sense leptina (esquerra) o amb leptina 100ng/ml (dreta) durant 72 hores. L'explant es va marcar amb anticòs anti-tubulina per veure les neurites. S'observa clarament que la leptina promou directament el creixement de les neurites d'ARC [199].

No obstant, no totes les regions del cervell que expressen receptor de la leptina responen a aquesta acció tròfica de l'hormona. Per exemple, el nucli DMH, que conté

nombroses neurones amb aquest receptor, mostra projeccions cap a PVN normals en els ratolins *ob/ob* [199].

5.- EL TUNGSTAT DE SODI

5.1 TRACTAMENTS ACTUALS CONTRA L'OBESITAT

El tractament contra l'obesitat segueix sent la ventafocs de tots els programes de gestió clínics de la malaltia, però sovint sense un final feliç: la gran expectació per trobar nous agents terapèutics fins ara no ha obtingut bons resultats, i els mètodes quirúrgics semblen fora de lloc en una època d'avançada i sofisticada tecnologia. La millor comprensió de la neuroregulació de la gana i la seva aplicació en les intervencions clíniques podria donar lloc a un enfocament més coherent pel tractament de l'obesitat [222, 223].

Avui en dia existeixen tres procediments operatius que s'utilitzen per tractar l'obesitat de forma quirúrgica: la reducció gàstrica, el *bypass* gàstric i la desviació biliopancreàtica [222, 223]. El tractament quirúrgic no deixa de ser un tractament agressiu i lògicament invasiu, sovint amb importants efectes secundaris (com la mala absorció i/o assimilació d'alguns nutrients com les vitamines). També és important tenir en compte que els efectes de les operacions sobre l'obesitat són reversibles, i que entre 12 i 15 anys després de les operacions, els pacients recuperen els nivells de guany de pes inicials.

Com a tractaments farmacològics, actualment hi ha dues categories de fàrmacs antiobesitat: aquells que actuen sobre el tracte gastrointestinal (inhibidors de lipases pancreàtiques) i aquells que actuen a nivell del sistema nerviós central per suprimir la gana:

Inhibidors de lipases pancreàtiques

a) **Orlistat (*Xenical*)**: és un derivat de la lipostatina aïllada de la bactèria *Streptomyces toxytricini* i actua com a inhibidor de lipases intestinals bloquejant el centre actiu d'aquestes, evitant la hidròlisi dels triglicèrids (TG) a àcids grassos i monoglicèrids, molècules capaces de ser absorbides a nivell intestinal. Així doncs, l'orlistat causa un descens del 30% en l'absorció intestinal de lípids [224, 225]. Els efectes secundaris descrits per aquest fàrmac inclouen diarrees, incontinència fecal, dolor abdominal i elevat contingut lipídic fecal. A més, s'ha descrit un increment en la hiperfàgia, a conseqüència de l'increment en l'alliberació de colecistocinina (CCK) [226]. Associat a la mala absorció causada pel fàrmac, els pacients també disminueixen l'absorció de vitamines liposolubles (vitamines A, D, E i K), per la qual cosa normalment s'associa al tractament una suplementació de la dieta amb vitamines.

El tractament amb orlistat s'ha mostrat eficaç en pacients obesos, ja que aquests perden un 10,3 % de pes corporal en un any, mentre que els tractats amb placebo només redueixen el pes corporal un 6,3 % [227]. La pèrdua de pes causada pel tractament s'observa que és significativa després de quatre anys de tractament.

Fàrmacs que actuen a nivell de sistema nerviós central

a) **Sibutramina (*Meridia, Reductil*)**: és una β -fenetilamina que, actuant sobre receptors monoaminèrgics, inhibeix la recaptació de serotonina i noradrenalina [228]. Aquesta inhibició provoca una disminució de la ingesta en els pacients tractats [18] i causa un increment en la termogènesi. Els efectes secundaris descrits per aquest fàrmac inclouen alteracions cardiovasculars com l'increment en la pressió sistòlica i diastòlica, increment del ritme cardíac, taquicàrdia, palpitations i vasodilatació. El tractament amb sibutramina en pacients obesos causa una baixada de pes corporal durant els sis primers mesos (11,3 Kg), seguida d'un lleuger guany de pes durant els 12 mesos següents, però menor que els pacients tractats amb placebo [228].

b) Lorcaserin (APD356): Aquest fàrmac actua com a agonista selectiu del receptor de la serotonina, i actualment es troba al final de la fase III dels estudis clínics. La fase II va demostrar una pèrdua de pes de fins a 3,6 Kg després de 12 setmanes de tractament, comparat amb els 0,3 Kg perduts pel grup placebo [229].

5.2.- BIOQUÍMICA I EFECTES DEL TUNGSTAT DE SODI

El tungstat de sodi és una molècula amb efectes antiobesitat descrits recentment, amb un gran potencial com a fàrmac per tractar aquesta malaltia.

El tungstè o wolframi (^{74}W), metall de transició del grup VIa, amb nombre atòmic de 74 i pes molecular de 183.85 g/mol, esdevé un cas particular entre els elements de la taula periòdica. Els elements amb pes molecular superior al del brom (^{35}Br) que presenten activitat biològica són escassos, i les excepcions més notables són el molibdè (^{42}Mo), el iode (^{53}I), l'estronci (^{38}Sr), el niobi (^{41}Nb), el bari (^{56}Ba) i el Tàntal (^{73}Ta) [230]. El tungstè presenta similituds amb alguns d'aquests elements, fins al punt d'arribar a parlar del tungstè com a anàleg del molibdè. El tungstè i el molibdè presenten estructures atòmiques i radis iònics similars, a més d'exhibir una química de coordinació semblants. Això ha suposat que fins el descobriment de proteïnes funcionals que contenen tungstè, se li assignés com a única funció la d'antagonitzar els molibdoenzims mitjançant la substitució dels àtoms de molibdè [231]. L'avanç en el coneixement del tungstè en biologia, ha permès demostrar l'existència de tungstoenzims en organismes procariotes actuant com a catalitzadors en reaccions claus del metabolisme del carboni, el nitrogen i el sulfur o mimetitzant els molibdoenzims. S'evidencia d'aquesta manera una similitud funcional d'ambdós elements en els sistemes biològics, de fet, les úniques formes de vida que no requereixen molibdè són organismes termòfils anaeròbics obligats i utilitzen el tungstè en el seu lloc [20, 232].

La química del tungstè és complexa i versàtil, ja que l'element pot adquirir múltiples estats d'oxidació (de -2 a +6) i formar complexos polinuclears, però a nivell biològic, només s'han identificat complexos mononuclears i en estats d'oxidació +4, +5

i +6 [233]. L'elevada capacitat de cessió d'electrons, típica dels metalls, permet la formació de polianions, donant lloc a la formació de diverses sals, entre les que destaca pel nostre interès, el tungstat de sodi.

Efecte del tungstat de sodi en la inhibició de fosfatases

El tungstat de sodi és una sal neutre de tungstè, de color blanc amb textura fina i cristal·lina. En solució aquosa es dissocia formant l'anió tungstat (WO_4^{-2}), d'estructura tetraèdrica similar a la presentada per el fosfat (PO_4^{-2}), i fonamental per exercir una de les seves funcions biològiques més importants, l'activitat inhibidora de fosfatases. Els processos de fosforilació i defosforilació de proteïnes esdevenen en moltes vies metabòliques importants punts de regulació, arribant a ser en certs casos el processos limitants de la senyalització intracel·lular, i per tant, d'interès biomèdic per la intervenció terapèutica en certes patologies. El tungstat, conjuntament amb d'altres oxoanions metàl·lics com el vanadat, molibdat o el cromat, han despertat interès per la seva capacitat inhibidora de fosfatases i d'altres enzims com les sulfatases [234]. Dels estudis realitzats amb la proteïna tirosina fosfatasa (PTP) de *Yersinia pestis* se sap que el mecanisme d'inhibició del tungstat és degut al canvi conformacional patit pel centre actiu de l'enzim al donar-se la substitució del pirofosfat ($\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$) per part del tungstat, d'estructura similar [235]. Estudis més recents en els que s'apliquen eines bioinformàtiques per dilucidar l'estructura dels centres actius de les fosfatases durant la interacció amb inhibidors selectius estan permetent comprendre millor el mecanisme d'inhibició del tungstat [236].

Efectes del tungstat de sodi en l'obesitat

La prevalença de l'obesitat i les malalties associades, així com les limitacions en eficàcia i seguretat dels fàrmacs antiobesitat dels que actualment es disposen [237], obliguen a cercar noves teràpies més eficaces i segures per tractar la malaltia. La reducció de pes en rates sanes tractades amb tungstat en l'estudi d'aquesta substància com a agent antidiabètic [238-241], van dirigir els estudis de Claret i col·laboradors

[242] a examinar l'efecte del tungstat en el tractament de l'obesitat, utilitzant un model de rata DIO (obesitat induïda per dieta) alimentada amb dieta de cafeteria [243], amb un pes corporal incrementat fins un 24% respecte les rates control, sense afectar en cap moment el seu creixement. L'administració oral de diferents dosis de tungstat durant un període de 30 dies, va mostrar que la dosi més efectiva en la pèrdua de pes, era de 2 mg/ml en la beguda, corresponent a una ingesta mitja de 227 mg/Kg/dia. Amb aquesta dosi es va produir una disminució del guany ponderal, sense disminuir la ingesta ni la taxa de creixement, a més d'observar-se l'absència d'efectes secundaris. També es va observar que després d'un període de suspensió del tractament, els animals recuperaven progressivament el pes, indicant que el tungstat no provocava un estat persistent de pèrdua de pes. L'efecte de la disminució de guany ponderal era acompanyat per una millora en la sensibilitat a la insulina, una disminució de l'adipositat i com a efectes secundaris deguts a aquesta disminució del pes corporal, una millora del perfil lipídic i metabòlic associat al fenotip obès (disminució de nivells circulants de TG, NEFA, leptina i insulina). El tractament també va provocar alteracions en els nivells d'expressió de proteïnes desacobladores, incrementant UCP1 en teixit adipós marró i UCP2 i UCP3 en teixit adipós blanc epididimari i en múscul esquelètic, apuntant un possible increment en la termogènesi. Així doncs, pels autors, les variacions de UCPs i dels gens involucrats en el transport i en l'oxidació de lípids, podrien causar un increment en la dissipació d'energia i una reducció en el contingut de TG en el teixit adipós, que conseqüentment contribuiria a la disminució de l'adipositat i del pes corporal, i a la millora en la sensibilitat a la insulina. Posteriorment, tots aquests resultats es van confirmar en realitzar estudis de proteòmica del teixit adipós marró, on els autors comparaven el teixit d'animals primis i obesos, tractats o no amb tungstat [244]. En aquest estudi es van identificar 20 proteïnes diana dels efectes del tungstat, involucrades en el cicle de Krebs, la glicòlisi, lipòlisi i oxidació d'àcids grassos, transport d'electrons i estat redox.

En posteriors estudis va quedar demostrat que el sistema de la leptina és essencial per les accions del tungstat, ja que si faltava el seu receptor (model de rates Zucker *fa/fa*) o la pròpia hormona (model de ratolí *ob/ob*), el tungstat era inefectiu

[245]. Aquests resultats mostraven que el tungstat no actua com un agonista del receptor de la leptina, sinó com un sensibilitzador de l'hormona.

Estudiant els nivells d'expressió dels neuropèptids hipotalàmics involucrats en el balanç energètic i regulats per la leptina, es va observar que el tractament amb tungstat modulava aquesta expressió en el mateix sentit que la leptina, bloquejant l'expressió dels neuropèptids orexigènics, i incrementant l'expressió dels anorexigènics, resultant tot plegat en una modulació de la ingesta i la despesa energètica [245].

En estudis *in vitro* on s'utilitzaven fibroblasts 3T3-F442A diferenciats a adipòcits, es va demostrar l'efecte potencial del tungstat en la diferenciació i funció d'aquestes cèl·lules [246]. Els adipòcits tractats amb tungstat presentaven una disminució en l'acumulació de triglicèrids i en la diferenciació adipocitària, observant-se a nivell genètic una disminució dels nivells de gens clau per la funció adipocitària: aP2 (factor de transcripció AP-2), ACC (acetil-CoA carboxilasa) i FAS (sintasa d'àcids grassos), i de gens clau per la diferenciació adipocitària: C/EBP α (proteïna potenciadora d'unió a CCAAT) i PPAR γ (receptor de peroxisoma activat per proliferació γ). Tots aquests canvis van ser parcialment bloquejats quan es va inhibir la via de les MAPK a nivell d'ERK 1/2, mostrant el paper crucial d'aquesta via per l'efecte del tungstat. Finalment, en aquest estudi es va observar un augment del consum d'oxigen per part dels adipòcits tractats amb tungstat. Tots aquests resultats concordaven amb els estudis *in vivo*, on disminuïa la massa greixosa principalment mitjançant la inhibició de la diferenciació adipocitària i incrementant la dissipació energètica [242, 244, 247].

Efectes del tungstat de sodi en la diabetis mellitus

En el darrer segle, la literatura científica ha fet referència a l'efectivitat de diversos compostos metàl·lics en el tractament de la diabetis mellitus (DM). Aquest és el cas del vanadat de sodi (NaVO₃), del qual l'any 1899 se'n van descriure per primera vegada els seus efectes beneficiosos. Ha estat, però, en els darrers anys, quan l'estudi

d'aquestes sals metàl·liques ha rebut un major impuls, sobretot en el camp de la DM, per presentar certa capacitat mimètica de la insulina *in vivo* i *in vitro*, com és el cas de les sals de vanadat [248-251], el selenat [250], i les sals de liti [252, 253]. Els primers estudis en els que s'estudiava l'efectivitat del tungstat com a agent antidiabètic van ser realitzats per Barberà i col·laboradors en el model de rata diabètica estreptozotocina (STZ), model de DM1. Aquests estudis van evidenciar que el tractament oral amb tungstat provocava una reducció dels valors de glicèmia i la reversió de les alteracions hepàtiques del metabolisme de la glucosa, aconseguint incrementar la capacitat del fetge per a utilitzar glucosa a través de la glicòlisi i de la síntesi de glicogen [238]. Els estudis realitzats a llarg termini van demostrar que el tungstat, a més de reduir els nivells de glucosa en sang sense provocar episodis d'hipoglucèmia, prevenien l'aparició d'alteracions renals i oculars induïdes per la diabetis, i reduïen la mortalitat. També descartaven efectes adversos del tractament a llarg termini [254].

Estudis realitzats en models experimentals de DM2, la rata nSTZ i la rata obesa Zucker diabètica (ZDF) també van demostrar l'eficàcia del tractament oral amb tungstat en arribar a normalitzar els nivells de glicèmia [239, 241]. En el model nSTZ, el tungstat també va ser capaç de restaurar la secreció d'insulina per part de la cèl·lula β en resposta a la glucosa. Paral·lelament, es va observar una recuperació parcial del contingut d'insulina, així com un augment en la expressió del mRNA de la preproinsulina. Aquests efectes es fonamenten en la restauració de la funció de l'illot pancreàtic, on es va observar un augment en la massa β cel·lular pancreàtica. Aquest augment de massa han d'estar lligats a processos proliferatius o neogènics (producció de cèl·lules β noves a partir de precursors ductals), i en el cas del tungstat els estudis van mostrar la presència de cèl·lules que expressaven insulina en zones properes als ductes, i en el teixit exocrí cèl·lules que expressaven PDX-1, suggerint activitat neogènica [255]. Els mateixos estudis van demostrar la capacitat del tungstat per activar el factor de transcripció PDX-1, responsable de la regulació del desenvolupament pancreàtic. Per una altra banda, en el model ZDF, es va observar una reducció considerable de la glicèmia i de l'hipertrigliceridèmia associada al model experimental. L'absència de canvis significatius en el perfil de fosforilació en proteïnes tirosines, suggerien que l'efecte del tungstat estava mitjançat per una millora parcial

del metabolisme hepàtic de la glucosa a través de l'activació de la síntesi de glicogen [256], juntament amb una reducció de la lipotoxicitat en el fetge [241].

Efectes del tungstat de sodi a altres òrgans

Múscul

El tractament amb tungstat del teixit muscular *soleus* aïllat dona lloc a un increment del transport de glucosa per part d'aquest teixit [257]. Estudis moleculars amb la línia cel·lular L6.C11 provinent de mioblasts de múscul esquelètic de rata van concloure que l'augment del transport de glucosa era degut a un augment en la quantitat i en la translocació a membrana del transportador de glucosa Glut4, de forma depenent a l'increment de fosforilació de la proteïna ERK 1/2 i de l'augment de transcripció de MEF2 (myocyte enhancer factor 2) per part del tungstat, així com la seva capacitat per activar la transcripció de Glut4 [258].

Sistema circulatori i cor

Utilitzant el model animal diabètic induït per una dieta rica en fructosa es va observar que el tractament amb tungstat prevenia la hipertensió i l'hiperresposta a norepinefrina associats a aquesta dieta [259]. Per altra banda, en un altre estudi realitzat en animals diabètics induïts per estreptozotocina, es va concloure que l'administració de tungstat disminuïa els triglicèrids i àcids grassos lliures circulants, i millorava el test de tolerància a la glucosa oral i diversos paràmetres cardíacs (pressió ventricular esquerra, ràtio de contracció i ràtio de relaxació) [260].

Sistema immunològic

Estudiant cèl·lules circulants del sistema immunitari en animals diabètics per estreptozotocina i tractats amb tungstat, es va mostrar que el tractament aconseguia normalitzar de forma total o parcial el número de leucòcits, el número i percentatge de limfòcits i neutròfils, les immunoglobulines en sèrum, l'activitat dels neutròfils i l'índex d'immunocomplexes solubles [261].

Cervell

Un estudi realitzat amb animals diabètics per estreptozotocina va demostrar que el tractament amb tungstat normalitzava l'activitat de la proteïna CK (Creatinin Kinasa) (elevada en animals diabètics), sense alterar l'activitat d'altres enzims també elevats (aspartat aminotransferasa i alanina aminotransferasa) [262].

Per altra banda, es va demostrar que el tungstat al cervell, tal i com passa en altres teixits, és capaç de fosforilar la proteïna ERK 1/2, donant lloc a la fosforilació i conseqüent inactivació de la proteïna GSK3 β (cinasa glicogen sintetasa 3 β). La inactivació de GSK3 β al cervell dóna lloc a que la proteïna tau no s'hiperfosforili [263]. Aquest fenomen s'ha observat tant en cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5T, com en extractes de còrtex cerebral de rates obesas i insulina resistents induïdes per dieta de cafeteria. La proteïna tau hiperfosforilada, juntament amb el pèptid β -amiloid són responsables de la formació dels dipòsits que acaben donant lloc a la malaltia d'Alzheimer. El fet que el tungstat disminueixi l'hiperfosforilació de tau, obre la porta a la possibilitat de l'ús d'aquesta sal per la prevenció de la malaltia d'Alzheimer.

II. Materials i mètodes

Un savi obtús és més ruc que un ignorant.

Molière.

1.- CULTIUS CEL·LULARS

Línia cel·lular N29/4

La línia cel·lular utilitzada en aquesta tesi s'anomena N29/4, i ha estat obtinguda a Cellutions Biosystems. Provenen de cultius primaris de cèl·lules hipotalàmiques embrionals de ratolí, immortalitzades amb SV40. Aquestes cèl·lules expressen únicament neuropèptids orexigènics.

Tots els experiments d'aquest treball amb les cèl·lules N29/4 han estat realitzats entre els passatges 20 i 45.

Medi de cultiu

DMEM (GIBCO), complementat amb:

- Glucosa 20nM
- Piruvat de sodi (Lonza) 10%
- Penicil·lina-estreptomicina 100 U/ml, 5%
- Fetal calf serum (FCS) 10%

Tripsinització cel·lular

Quan les cèl·lules es troben entre un 80-100% de confluència cal tripsinitzar-les per expandir el cultiu.

Protocol

Es treu el medi de cultiu i es renten les cèl·lules amb PBS estèril.

S'afegeix tripsina i es manté el flascó a l'incubador.

S'atura la reacció afegint el mateix medi de cultiu i es recuperen les cèl·lules.

Es realitza el comptatge cel·lular amb càmera de *Neubauer*.

Una part dels cultius es criopreserva i la resta s'expandeix en diferents flascons.

Criopreservació

Es criopreserven les cèl·lules en alíquotes de 1×10^6 cèl·lules per criotub, afegint un 10% de DMSO per protegir-les. Els criotubs es congelen a -80°C O/N i posteriorment són emmagatzemades en un tanc de nitrogen líquid.

Tractaments

Reactius

- Leptina 1nM
- Tungstat 100 μM
- Inhibidor IV 20 μM dissolt en DMSO
- U0126 20 μM dissolt en DMSO
- LY294002 20 μM dissolt en DMSO

Pels estudis d'expressió gènica, les cèl·lules es tracten amb leptina o tungstat entre 30 minuts i 2 hores. Passat aquest temps, es renten amb PBS i es procedeix a l'extracció de RNA.

Pels estudis d'expressió proteica, les cèl·lules es tracten amb leptina o tungstat durant 5 minuts. Passat aquest temps, es renten amb PBS i es procedeix a l'extracció de les proteïnes.

Pels estudis amb l'inhibidor IV, les cèl·lules es pre-tracten durant 2 hores amb l'inhibidor. Passat aquest temps, es segueixen els tractaments oportuns.

Pels estudis amb els inhibidors U0126 i LY294002, les cèl·lules es pre-tracten durant 1 hora amb l'inhibidor. Passat aquest temps, es segueixen els tractaments oportuns.

En els estudis amb inhibidors, en tots els casos en les cèl·lules no tractades amb inhibidor s'hi afegeix el mateix volum de DMSO, per tal de descartar interferències d'aquest producte químic.

2.- EXPRESSIÓ PROTÈICA

Extracció i quantificació de proteïna

Reactius

- Tampó de lisi: Tris 50mM pH 7.0, EDTA 5mM, NaCl 150mM, Tritó 1%, pirofosfat de sodi 10mM, PMSF 10mM, ortovanadat sòdic 100mM, cocktail d'inhibidors de proteases 10x (SIGMA).
- Neu carbònica.
- Kit de quantificació de proteïnes DC (BioRad) basat en el mètode de Lowry.

Equipament i material

- Placa de 96 pous
- Bany de 37°C
- Centrífuga refrigerada
- Espectrofotòmetre

Protocol

Es renta la placa de cultiu amb PBS a 4°C.

Sempre treballant sobre gel, es recuperen les cèl·lules amb tampó de lisi.

Es fan 3 cicles de congelació-descongelació amb l'ajut de neu carbònica i un bany a 37°C .

Es fa una centrifugació durant 20 minuts a 14000 rpm, a 4°C.

Recuperem el sobrenedant i es quantifica la proteïna obtinguda mitjançant el protocol DC de BioRad:

- 1 µL de mostra per pou en una placa de 96 pous.
- 25 µL del reactiu A' (dilució 1:50 dels reactius S:A).
- 200 µL del reactiu B.
- Es deixa la placa protegida de la llum durant 15 minuts i es procedeix a la lectura de la placa a 750 nm.

3.- EXPRESSIÓ GÈNICA

Extracció RNA total

Reactius

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroform
- Isopropanol
- Etanol 75%
- Aigua RNase free

Equipament i material

- Vòrtex
- Espectrofotòmetre

Protocol

Aquest mètode es basa en la utilització del reactiu Trizol Reagent, seguint les instruccions del fabricant i adequant el protocol al nostre cultiu cel·lular.

Es fa un rentat de les cèl·lules amb PBS a 4°C.

Es posen 500 µL de Trizol/pou i es recullen les cèl·lules amb l'ajuda d'una pipeta. Es congelen a -80°C durant 4-16 hores.

Es descongelen i s'incuben les mostres 5 minuts a T/A.

S'afegeixen 350 µL de cloroform a cada mostra i s'agita vigorosament un *vòrtex* durant 15 segons.

S'incuben les mostres 2-3 minuts a T/A.

Es centrifuguen les mostres a 14000 rpm durant 30 minuts a 4°C.

Es recull la fase superior del gradient en un tub *ependorf*.

S'afegeixen 500 µL d'isopropanol i s'incuba 10 minuts a T/A per tal que l'RNA precipiti.

Es centrifuguen 10 minuts a 14000 rpm a 4°C.

Es descarta el sobrenedant i es renta el sediment amb 1ml d'etanol 75%.

Es centrifuga a 10000 rpm durant 10 minuts a 4°C.

Es descarta el sobrenedant i es deixa assecar el sediment a l'aire.

Es ressuspen en un volum adequat d'aigua RNAsa free.

Es quantifica la concentració de la mostra en un espectrofotòmetre. També es valora la puresa (ràtio d'absorvència 260/280, entre 1.8-2).

Retro-transcripció (RT-PCR)

Tractament amb DNAsa:

Reactius

- DNAsa I (Invitrogen)
- Buffer DNAsa I (Invitrogen)
- EDTA 25mM

Equipament i materials

- Bloc tèrmic

Protocol

Tractarem 3 µg de RNAtotal en cada reacció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
X µg de RNA	n µL
buffer DNAsa I	1 µL
DNAsa I	1 µL
Aigua estèril	10 µL

La mescla es deixa a T/A durant 15 minuts.

La reacció s'atura amb 1 µL d'inhibidor i mantenint les mostres durant 5 minuts a 65°C.

Retrotranscripció:

Reactius

- dNTP mix
- Random primers d(N6)5'PO4 (Invitrogen)
- Aigua estèril

- Buffer 5x (Invitrogen)
- DTT
- SuperScript III (Invitrogen)

Equipament i materials

- Termociclador (G-storm)

Protocol

Utilitzem 3 µg de RNA total tractat amb DNAsa per fer la reacció de retro-transcripció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
X ng RNA tractat	n µL
dNTP mix 10mM	1 µL
Random <i>primers</i> 1mM	0,1 µL
Aigua estèril	up to 13µL

S'escalfa durant 5 minuts a 65°C. Després es col·loquen les mostres ràpidament a 4°C.

S'afegeix a cada tub els següents reactius:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
Buffer 5x	4 µL
DTT 0.1M	2 µL
SuperScript III	1 µL

S'escalfa durant 5 minuts a 25°C.

S'escalfa durant 60 minuts a 50°C, i s'inactiva la reacció escalfant a 70°C durant 15 minuts. El volum final obtingut és de 20 µL, i s'en prepara una dilució 1/5 per treballar.

PCR quantitativa (Real time PCR)

El sistema de PCR quantitativa utilitzat es basa en la tecnologia SYBR green (Applied Biosystems), basada en la incorporació al DNA de doble cadena d'un

fluorocrom que es troba inactiu en la seva forma lliure, i que comença a emetre fluorescència en el moment que s'uneix al DNA. Així doncs, aquest fluorocrom emet fluorescència de forma proporcional als nombre d'amplicons generats en la reacció, i aquests son proporcionals al nombre de còpies del gen que hi havia a l'inici en la mostra.

El mètode que es va emprar, utilitza el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Pel procés d'amplificació i anàlisis es va emprar el kit comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que combina el fluorocrom *SYBR Green 1 Dye*, la polimerasa *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, un mix de *dNTPs* amb *dUTP* i un tampó optimitzat per fer la reacció.

El llindar de fluorescència, o *threshold*, es va optimitzar per cada gen estudiat, i en base a aquesta mesura, es va determinar en nombre de cicles (Ct) que li calia a cada mostra per arribar al valor del llindar de fluorescència. Així, les mostres amb un menor nombre de còpies del gen estudiat a l'inici de la reacció, tardaran més cicles en assolir els nivells de fluorescència llindar. Per tant, la mesura del Ct ens permetrà determinar els nivells d'expressió d'un gen de forma relativa entre dues o més mostres.

Per la mesura de cada gen es va procedir de la següent manera:

Validació de la linealitat de la PCR.

Aquest apartat de validació consisteix en comprovar que, amb la concentració d'encebadors escollida, la diferència d'amplificació entre les diferents quantitats de cDNA és constant i, per tant, la relació de Ct és lineal.

Procediment:

Es fan dilucions de cDNA per comprendre valors de 1 a $1/10^5$, amb aigua.

Es prepara la mescla de reacció:

<u>Reactius</u>	<u>Volum (per reacció)</u>
Power SYBR Green Master Mix 2X	10µl
Encebador 3' (2µM)	3µl
Encebador 5' (2µM)	3µl

Es realitza l'amplificació amb 4µl de cDNA i afegint-hi 16µl de la mescla de reacció. Les condicions d'amplificació son les següents:

- 50 °C durant 2 minuts
- 95 °C durant 10 minuts (activació o *hot start* de la polimerasa)
- 40 cicles de:
 - 95 °C durant 15 segons
 - 60 °C durant 1 minut

Un cop acabada la reacció de PCR cal representar els resultats com a Ct enfront del logaritme de la concentració de cDNA, i es determina el rang de linearitat de les mostres. A més, es determina l'eficiència de la reacció amb la mesura del pendent, així, valors de pendent de -3,33 indiquen una eficiència de la PCR del 100%. Si el pendent és superior a -3,33 indica que no s'ha obtingut una eficiència del 100%, és a dir, que no totes les cadenes s'amplifiquen en el cicle següent.

Al final de la seqüència de cicles de cada amplificació es realitza una corba de dissociació (un gradient de temperatura que augmenta un grau cada 15 segons des de 60 fins a 95 °C), a fi de comprovar que el producte amplificat és únic. En augmentar la temperatura a la qual està sotmesa la mostra, el DNA de doble cadena (dsDNA) que s'ha format es va separant. Com que el SYBR green només emet fluorescència quan està entre una doble cadena de DNA, aquesta va disminuint en anar augmentant la temperatura. Així doncs, si en la reacció s'haguessin amplificat dos seqüències diferents, en el gràfics de dissociació obtindríem dos pics a diferent temperatura. Aquesta és una altre forma d'assegurar-nos el correcte funcionament de la reacció de PCR i poder validar els resultats.

Mesura de les mostres

Aquest procés és idèntic al descrit per la validació de la linealitat. L'únic que canvia és la quantitat de mostra que s'afegeix en el tub de reacció, que ha d'estar dins el rang de linealitat determinat prèviament. Per tots els nostres experiments la quantitat de mostra de partida va ser de 4µl d'una dil·lució 1/50 del producte de retrotranscripció. A cada experiment es va afegir una corba patró d'una mostra diluïda

des de 1 fins a $1/10^5$, per determinar la eficiència de la reacció, i a més es va realitzar la corresponent corba de dissociació per tal de verificar l'amplificació d'un únic fragment.

S'utilitza el gen *Cyclophilin A* com a control per normalitzar l'expressió gènica. S'introdueix també un control negatiu de la PCR on es posa H₂O enlloc de la mostra de cDNA, per comprovar que no hi ha contaminació per DNA en cap dels reactius.

Disseny dels encebadors

Els encebadors es dissenyen mitjançant el programa Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems) a partir de la seqüència de l'mRNA obtinguda de la base de dades NCBI. Cal seguir uns criteris determinats de mida (la llargada del fragment a amplificar ha de ser de 50-150 parells de bases), i a ser possible, que l'amplicó quedi situat entre dos exons diferents.

Encebadors emprats:

Cyclophilin A

- Encebador 5' : 5' GATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACA 3'
- Encebador 3' : 5' TCAGTCTTGGCAGTGCAGATAAA 3'

cFOS

- Encebador 5' : 5' CGGGTTTCAACGCCGACTA 3'
- Encebador 3' : 5' TTGGCACTAGAGACGGACAGA 3'

cMYC

- Encebador 5' : 5' TCTCCATCCTATGTTGCGTC 3'
- Encebador 3' : 5' TCCAAGTAACTCGGTCATCATCT 3'

AgRP

- Encebador 5' : 5' GTTCCCAGAGTCCCAGGTCTA 3'
- Encebador 3' : 5' TTCTGCTCGGTCTGCAGTTG 3'

NPY

- Encebador 5' : 5' ATGCTAGGTAACAAGCGAATGG 3'
- Encebador 3' : 5' TGTCGCAGAGCGGAGTAGTAT 3'

SOCS3

- Encebador 5' : 5' CACCTGGACTCCTATGAGAAAGTG 3'
- Encebador 3' : 5' GAGCATCATACTGATCCAGGAACT 3'

STAT3

- Encebador 5' : 5' GCAGTTTGGAAATAACGGTGAAG 3'
- Encebador 3' : 5' ACTCCGAGGTCAGATCCATGTC 3'

JAK2

- Encebador 5' : 5' GCGAATGATTGGCAATGATAAA 3'
- Encebador 3' : 5' CTTGGCAATCTCCGTTGCT 3'

Quantificació de les mostres

La quantitat relativa d'RNA present a cada mostra es va expressar com a $\Delta\Delta Ct$, que representa l'increment de la Ct respecte la mostra amb que es vol comparar. El càlcul de $\Delta\Delta Ct$ es va realitzar de la següent manera:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{mostra referència}} - Ct_{\text{mostra}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \frac{1}{10^{-\left(\frac{\Delta Ct}{\text{pendent}}\right)}}$$

El valor del gen el normalitzem amb el valor del $\Delta\Delta Ct$ de la cyclophilin A.

4.- PROTEÒMICA

Preparació de la mostra: *clean-up*

Reactius

- Tampó 2-D (urea 7M, tiourea 2M i CHAPS 2% p/v)
- Kit 2D clean up (Amersham)

Equipament i material

- Centrífuga
- Vórtex
- Tires per mesurar el pH

Protocol

S'agafa 1-100 µL de mostra (que contingui entre 1 i 100µg).

S'afegeixen 300µL PRECIPITANT i s'agita.

S'incuba en gel durant 15 minuts.

S'afegeixen 300 µL de reactiu CO-PRECIPITANT i s'agita.

Es centrifuga a 14000 rpm a 4°C durant 5 minuts.

Descartem el sobrenadant.

Tornem a centrifugar durant 1 minut a 14000 rpm a 4°C per acabar de retirar el sobrenadant.

S'afegeixen 40µL de reactiu CO-PRECIPITANT.

S'incuba en gel durant 5 minuts.

Es centrifuga a 14000rpm 4°C durant 5 minuts.

Descartem el sobrenadant.

S'afegeixen 25 µL d'aigua (embotellada) i s'agita.

S'afegeix 1 ml de wash buffer (prèviament refredat a -20°C).

S'afegeixen 5 µL de WASH ADDITIVE i s'agita.

Es posen els *eppendorfs* a -20º mínim durant 30minuts.

Es centrifuga 5 minuts a 14000rpm 4°C.

Descartem el sobrenadant.

Deixem assecar el pélllet a sota la campana.

Resuspenem les mostres amb T2D-DIGE pH8.5 i ajustem el pH de la mostra utilitzant T2D-DIGE pH 9.5

Quantificació de la mostra

Reactius

- Kit quantificació de proteïnes RCDC (BioRad) basat en el mètode de Lowry

Equipament i material

- Centrifuga
- Vórtex
- Espectrofotòmetre

Protocol

Es preparen dilucions de la mostra en un volum final de 12.5 µL.

S'afegeixen 62.5 µL del reactiu RCDC I a cada mostra, s'agita mitjançant *vórtex* i es deixa un minut a T/A.

S'afegeixen 62.5 µL del reactiu RCDC II, s'agita mitjançant *vórtex* i es centrifuga a 14000 rpm durant 5 minuts a 4°C.

Es descarta el sobrenadant de cada mostra.

Cal repetir els passos anteriors (des del reactiu RCDC I fins a descartar el sobrenadant).

S'afegeixen 63.5 µL del reactiu A' a cada mostra (el reactiu A' és una dilució 1:50 del reactius S i A), i s'agita mitjançant *vórtex*.

Es plaquegen en placa de 96 pous 25 µL de cada mostra.

S'afegeixen 200 µL del reactiu B i es remena cada pou amb una punta.

Es deixa 15 minuts a T/A i es llegeix a l'espectrofotòmetre a una absorvància de 750 nm.

GELS 2D

Hidratació dels gels de la primera dimensió

Reactius

- Tampó d'hidratació (DeStreak rehydration solution, Amersham)
- Tampó IPG (Immobiline™ DryStrip gels buffer) (pH 3-10) 0.5% v/v (Amersham)
- Oli mineral (BioRad)

Equipament i material

- Tires IPG de 24 cm pH 3-10 (Immobiline™ DryStrip pH 3-10 24cm) (Amersham)
- Safata amb carrils individuals per gels IPG

Protocol

Per a cada 3ml de tampó d'hidratació hi afegim 15 µL d'IPG.

Per a cada gel de 24cm utilitzarem 450 µL de tampó.

Afegim el volum de tampó al carril de la safata, i lentament hi deixem caure el gel, de forma que el tampó quedi repartit homogèniament sobre el gel, i que per tant aquest es pugui hidratar de forma homogènia.

Ho cobrim amb oli mineral per evitar evaporacions i ho deixem hidratant O/N.

Tinció de la mostra amb fluoròfors i preparació per la primera dimensió

Reactius

- CyDye DIGE Fluor (Cy2, Cy3, Cy5)
- Dimetilformamida (DMF)
- Lisina
- Tampó de càrrega (per 1ml de tampó 2D hi afegim 5 µL d'IPG, 10mg de DTT i una punta de blau de bromofenol)

Equipament i material

- Vórtex
- Centrífuga

Protocol

S'afegeixen 0.8µL del Cy corresponent (Cy2, Cy3 o Cy5) a cada mostra, es fa un *vórtex* i es deixa en gel durant 30 minuts. A partir d'aquest punt les mostres hauran d'estar protegides de la llum en tot moment.

Passat aquest temps, s'afegeix el mateix volum de lisina (0.8 µL) i s'agita.

A cada gel hi podem posar tres mostres diferents, cada una marcada amb un fluoròfor diferent. El següent pas, doncs, serà mesclar les tres mostres de cada gel, agitar i centrifugar.

Segons el volum total de mostra, s'afegirà un volum diferent de tampó de càrrega.

Primera dimensió

Enfoc isoelèctric: separació de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric (pI)

Reactius

- Oli mineral
- Tampó de càrrega
- Mostra preparada en l'apartat anterior

Equipament i material

- Gels IPG de 24 cm pH 3-10 hidratats
- Paper Whatmann
- Safata amb elèctrodes, i carrils individuals per gels IPG
- Font d'electroforesi (Protean IEF cell BioRad)

Protocol

Es netegen els gels (prèviament hidratats O/N) amb aigua destil·lada i s'eixuguen amb dos papers Whatmann prèviament saturats també amb aigua destil·lada.

Es col·loquen els gels dins la safata dels elèctrodes. En aquest cas la primera dimensió va cap amunt.

Posem dos papers Whatmann saturats d'aigua a la part superior i inferior del gel per tal que retenguin les impureses que hi pugui haver a la mostra.

Posem els elèctrodes en contacte amb els papers Whatmann.

Es col·loquen els pous sobre cada gel, i es carrega la mostra (fins a un màxim de 100 μL).

Es cobreix el pou i tot el gel amb oli mineral i es posa a córrer O/N, fixant la resistència a 90 $\mu\text{A/gel}$ com a màxim, i fins a arribar a un voltatge de 62 KV/hora.

Un cop finalitzada la primera dimensió, les tires es poden guardar a -80°C durant una setmana com a màxim, o es pot procedir directament a la segona dimensió.

Segona dimensió

Separació de les proteïnes segons el seu pes molecular.

Preparació de la mostra:

Reactius

- Solució mare B i C (urea 6M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl 375 mM pH8.8, glicerol 20% (v/v)).
- Solució B de treball (solució mare + DTT 130 mM).
- Solució C de treball (solució mare + iodoacetamida 135 mM i una punta de blau de bromofenol).
- Gels IPG que han corregut la primera dimensió O/N.

Protocol

S'incuben els gels amb la solució B durant 15 minuts i en agitació, dins una safata amb carrils individuals per gels IPG.

S'incuben els gels amb la solució C durant 15 minuts i en agitació.

La mostra ja està llesta per córrer la segona dimensió.

Preparació del gel SDS-PAGE:**Reactius**

- Acrilamida 30%
- Tris-HCl 3M, pH 8.8
- SDS 10%
- APS 10%
- TEMED

Equipament i material

- Vidres (20,5x25 cm) i separadors de 1mm pel muntatge de gels verticals.

Protocol

Per preparar 400 mL d'un gel del 10 %:

<u>Reactius</u>	<u>Volum</u>
Acrilamida 30%	160 mL
Tris-HCl 3M, pH 8.8	50 mL
SDS 20%	2,92 mL
APS 10%	2 mL
TEMED	560 µL
Aigua estèril miliQ	185 mL

S'aboca la barreja en un gel vertical amb separadors de 1 mm, deixant aproximadament 0.5 cm lliures a la part de superior. Es deixa polimeritzant O/N.

Segona dimensió:**Reactius**

- Agarosa 0,5%
- Tampó d'electroforesi (Tris-HCl 25 mM pH a 8.8, glicina 250 mM, SDS 0.1%)

Equipament i material

- Gel IPG equilibrat
- Gel SDS-PAGE
- Font d'electroforesi amb sistema de refrigeració
- Escàner de fluorescència (Typhoon, GE Healthcare)
- Aplicació informàtica DeCyder (GE Healthcare)

Protocol

Es desfà al microones l'agarosa.

Es diposita el gel IPG dins els vidres i es fa baixar fins que entri en contacte amb el gel d'acrilamida. Ha de quedar totalment horitzontal.

S'afegeix l'agarosa desfeta per sobre el gel IPG de forma que quedi immobilitzat.

Es posa a córrer a 200 V durant 30 minuts i 2 V / gel O/N. Cal mantenir el sistema de refrigeració.

Finalitzada la segona dimensió, s'escanegen els gels.

Anàlisi dels resultats

Els resultats s'analitzen mitjançant l'aplicació informàtica DeCyder, d'Amersham, la qual ens permetrà veure les taques o *spots* diferencials entre els grups de tractament.

Escissió de les taques (*spots*)

Un cop analitzats els gels, les taques diferencials es retallen per tal d'identificar les proteïnes.

Reactius

- Fluoròfor Flamingo

Equipament i material

- Spot picker (GE Healthcare, servei de proteòmica de l'IDIBAPS)

- Aplicació informàtica DeCyder (GE Healthcare)

Protocol

S'haurà de repetir el procés sencer de primera i segona dimensió, però en aquest cas tenyint les mostres amb Flamingo enlloc de Cy.

Un cop tenim el gel, es compara amb els resultats obtinguts a partir de la tinció amb Cy analitzats amb el DeCyder, i s'hi marquen les taques que havíem escollit.

Es passa el gel per l'Spot picker (*GE Healthcare*) i l'aparell retallarà les taques que havíem pre-seleccionat.

Identificació de les taques (*spots*)

Les mostres es porten al servi científic-tècnic del PCB (unitat de proteòmica del Parc Científic) per ser analitzades mitjançant les tècniques d'espectrometria de masses MALDI TOF-TOF i/o MALDI Q-TOF.

5.- ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ, DIETES, TRACTAMENTS AMB TUNGSTAT DE SODI I MANIPULACIÓ

Animals d'experimentació

Tots els animals emprats en aquesta tesi van ser subministrats per l'empresa Charles River Laboratories Inc. i es van mantenir a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Els animals es van mantenir estabulats en condicions ambientals controlades (cicles de llum i fosc de 12h, temperatura de 21 ± 2 °C i humitat relativa del 50-60 %). Tots els protocols experimentals que es van realitzar durant aquesta tesi es van dur a terme seguint les normes de manipulació d'animals d'experimentació, i van estar prèviament autoritzats pel comitè ètic d'experimentació animal de la Universitat de Barcelona.

Els animals utilitzats en aquesta tesi van ser:

- **Rata Wistar.**

Rattus norvegicus mascles de la soca Wistar de 10 setmanes d'edat, equivalent a 250-275 gr.

- **Ratolí c57bl6.**

Mus musculus mascles de la soca c57bl6 de 10 setmanes d'edat.

Dietes

Els animals van ser alimentats *ad libitum* amb una dieta de pinso estàndard (tipus AO4, Panlab, Barcelona, Espanya) o bé amb una dieta rica en greixos (Research diets, referència D12492), segons s'indica en cada cas. L'accés a l'aigua de beguda va ser lliure durant tot el procés experimental per ambdós grups dietètics.

Les composicions a nivell de nutrients i energia derivada de cada nutrient, de les dues dietes emprades van ser:

	Dieta amb pinso estàndard		Dieta amb pinso ric en greixos	
	Composició (%)	Energia derivada (%)	Composició (%)	Energia derivada (%)
Proteïnes	15,5	21	26,2	20
Lípids	3,3	8	34,9	60
Carbohidrats	68,8	71	26,3	20
Altres	10,4	-	9,9	-
Energia total (Kcal/g)	3,0		5,24	

Als ratolins alimentats amb dieta rica en greixos se'ls va sotmetre a un període previ d'inducció d'obesitat, durant el que es va administrar durant 4 setmanes prèvies a qualsevol tractament o mesura, la dieta rica en greixos.

Tractament oral amb tungstat de sodi

Els diferents models animals alimentats amb la mateixa dieta, es van dividir en dos grups, tractats i no tractats. El tractament va consistir, si no s'explicita el contrari, en l'administració oral de tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; SIGMA) a la concentració de 2mg/ml en l'aigua durant 14 dies segons l'experiment.

Monitoratge del pes i la ingesta

El monitoratge del pes i de la ingesta de cada animal es va realitzar diàriament.

Extracció del líquid cefaloraquidi

Animals

- Rata Wistar de 10 setmanes o de 250gr.

Material

- Pinces
- Bisturí
- Eppendorf
- Catèter polythene (diàmetre interior 0.58mm, exterior 0.96mm)
- Agulles 23G x 1 ¼ 0,6x30mm.
- Xeringa
- Llima per agulles

Protocol

Preparació del mètode d'extracció del líquid cefaloraquidi:

Per una rata, agafem 2 agulles 23G i uns 40cm de catèter. Desmuntem la primera agulla de forma que només quedi la part metàl·lica, i llimem la punta de forma que no punxi, vigilant que no quedi obturada. Ho unim a un extrem del catèter. L'altre agulla l'unim a l'altre extrem del catèter, unida a una xeringa.

Extracció del líquid cefaloraquidi:

Es fixa l'animal a un aparell de Stereotaxia de forma que el cap li quedi perfectament immobilitzat.

Amb l'ajuda d'un bisturí, tallem la pell i la primera capa de múscul, des de les orelles fins a la zona interescapular. Amb l'ajuda d'unes pinces, anem separant la resta de múscul fins que es noti perfectament el contorn de les vèrtebres i el crani amb les pinces.

L'extracció es fa a partir de la *cisterna magna*, accedint-hi entre el final del crani i la primera vèrtebra. Aquí és on es punxa amb l'agulla, notant una membrana dura que es trenca (la duramàter), i comencem a aspirar amb la xeringa, molt lentament, observant el catèter fins que veiem que es comença a omplir de sang. El líquid cefaloraquidi és completament transparent, així que de seguida es veu si hi ha contaminació de sang. En aquest moment parem de seguida perquè no es barregin la sang i el líquid.

Retirem l'agulla i dipositem el líquid en un *ependorf*.

Stereotaxia en rata (injecció ICV a tercer ventricle sense canulació)**Animals**

- Rata Wistar de 10 setmanes o 250gr.

Reactius

- Anestèsic Pentobarbital, dosi: 100ul/100gr (a partir d'una solució de 60mg/ml)
- Líquid cefaloraquidi artificial (aLCR):
 - NaCl 125 mM
 - KCl 2.5 mM
 - CaCl₂ · 2H₂O 1.26 mM
 - MgCl₂ · 6H₂O 1.18 mM
 - Diluir en 1l d'aigua destil·lada o MiliQ
- Tungstat 4μM (diluït en líquid aLCR)
- Leptina 2,5 gr/l (diluïda en aLCR)
- Analgèsic Buprenorfina, dosi: 0,025 mg/kg (a partir d'una solució de 0,3 mg/ml)

Material

- Aparell de Stereotaxia (Kopf)
- Manta tèrmica per rates
- Trepà (Fine Science Tools)
- Pinces
- Bisturí
- Bomba injecció (Harvard apparatus)
- Catèter polythene (diàmetre interior 0.58mm, exterior 0.96mm)
- Xeringues
- Grapadora quirúrgica (Fine Science Tools)

Protocol

S'anestesia l'animal i s'injecta l'analgèsic, tot per via intraperitoneal.

Fixem l'animal a l'aparell, comprovant que estigui completament immobilitzat.

Amb l'ajuda d'un bisturí tallem la pell de sobre el crani completament, fins que l'os quedi al descobert.

Es busquen les coordenades zero (bregma) i les anotem per poder fer els càlculs corresponents per trobar coordenades correctes on injectar: el tercer ventricle es troba a -2,64mm antero-posteriors de bregma, -0mm laterals al sinus migsagital i -10,2mm per sota del crani.

Trepanem en el punt exacte obtingut a partir de les coordenades.

Introduïm lentament el catèter amb l'agulla, i amb la bomba injectem 4 µL de tungstat, leptina (rates control positiu) o aLCR (rates control).

Retirem l'agulla lentament, netegem la ferida amb solució de iode i suturem la incisió utilitzant la grapadora quirúrgica.

Stereotaxia en rata (canulació a tercer ventricle)

Animals

- Rata Wistar de 10 setmanes o 250 gr

Reactius

- Els mateixos que per l'ICV sense canulació
- Ciment dental (PalaDur)

Material

- Els mateixos que per l'ICV sense canulació
- Cànules (Plastics one)
- Taps cànules (Plastics one)
- Guies internes per la cànula (Plastics one)
- Cargols (Plastics one) i tornavís
- Pipetes pasteur

Protocol

Es segueix el mateix protocol que per la injecció ICV sense canulació fins al punt de la perforació amb el trepà a les coordenades del tercer ventricle.

Arribats a aquest punt, caldrà fer tres forats més, sense arribar a perforar el crani, per fixar-hi tres cargols que ens ajudaran a mantenir immòbil el ciment que aguantarà la cànula. Fixem els cargols, introduïm la cànula i hi apliquem el ciment fixador. Esperem que s'assequi, i molt lentament retirem l'animal de l'aparell.

Quan es vulgui procedir a la injecció, s'utilitzarà la guia interna connectada al catèter, i utilitzant la bomba es procedirà a fer la injecció. L'animal estarà despert i conscient durant el procediment.

Enriquiment de nuclis hipotalàmics**Animals**

- Ratolí c57bl6 control
- Ratolí c57bl6 DIO (4 setmanes d'inducció a l'obesitat)

Reactius

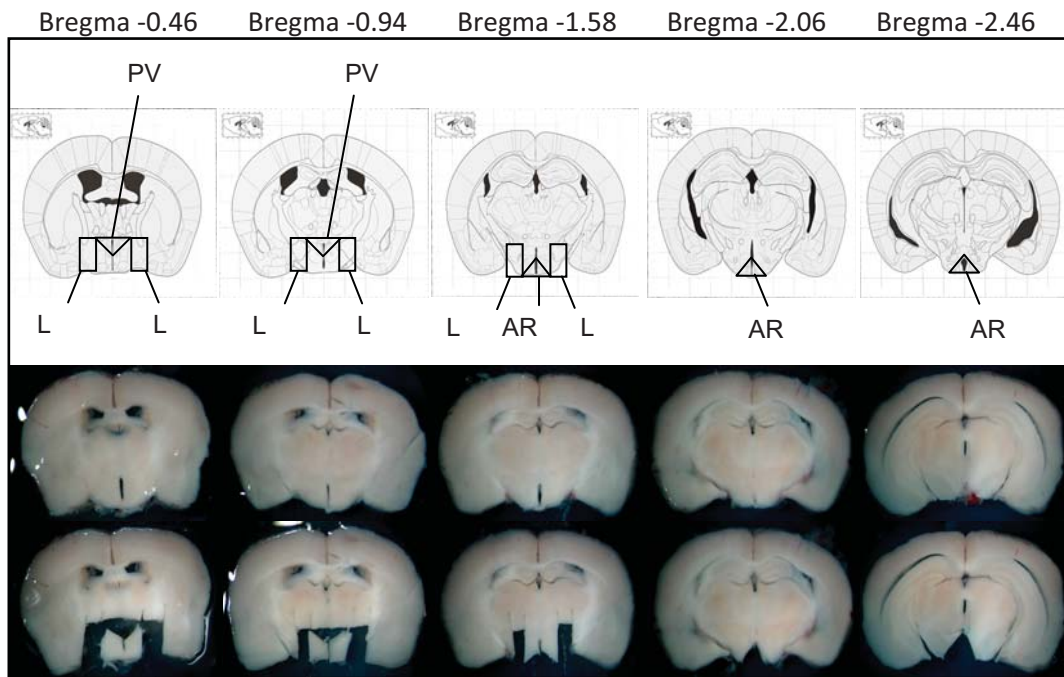
- Tampó inhibidor de proteases glucosat (sucrosa 200mM, NaHCO₃ 28mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 7mM, NaH₂PO₄ 1,25mM, CaCl₂ 0,5mM, L-ascorbate 1mM, glucosa 8mM, pH 7.4, complementat amb el cocktail inhibidor de proteases).
- Cocktail inhibidor de proteases:
 - COMPLETE (protease inhibitor cocktail tablets) (Roche)
 - 10 mM NaF
 - 10 mM Na phosphate
 - 10 mM sodium molybdate
 - 10 mM vanadate

Material

- Vibràtom (Campden Instruments)
- Bisturí
- Lupa binocular
- Pinces
- Pinzell
- Pega ultra-ràpida
- Placa de cultiu de 6 pous

Protocol

Es sacrifica l'animal i ràpidament se n'extreu el cervell. S'enganxa amb pega al suport per tallar i es deixa assecat la pega. Es diposita el suport amb el cervell dins la cubeta del vibràtom, plena de tampó glucosat prèviament refredat a 4°C. Molt lentament, es talla el teixit amb el vibràtom, obtenint talls de 500µm de gruix. Amb un pinzell es pesquen els talls de cervell i es posen sobre l'agarosa. Sota la lupa i amb un bisturí, es fan els talls corresponents a cada nucli hipotalàmic, tal com mostra l'esquema:



Els talls es posen en un *ependorf* i ràpidament es congelen a -80°C .

III. Hipòtesi i objectius

*En la bogeria hi ha un cert plaer
que només els bojos coneixen.*

John Dryden.

L'obesitat s'ha convertit en un problema sanitari greu a nivell mundial, i és important poder-hi trobar solucions. El tungstat, tal i com han demostrat els diversos estudis desenvolupats en el nostre laboratori, és un fàrmac amb un gran potencial en el tractament de l'obesitat. Tot i haver-se descrit àmpliament els diversos efectes del tungstat en diferents models experimentals, el mecanisme d'acció n'és encara desconegut.

Els resultats preliminars indiquen que la leptina i la seva via de senyalització juguen un paper important en les accions del tungstat sobre l'homeòstasi energètica. Donat que l'hipotàlem és una de les dianes més rellevant de la leptina i que és des d'aquí on aquesta hormona regula el balanç energètic, la nostra hipòtesi de treball és que el tungstat desenvolupa part de les seves accions a aquest nivell per poder regular el guany de pes corporal i la ingesta dels animals tractats.

Els objectius plantejats van ser els següents:

Objectiu I:

1. Demostrar que el tungstat travessa la barrera hematoencefàlica i que té efectes directes sobre la ingesta i el pes corporal quan s'administra per via central.
2. Demostrar que el tungstat té efectes directes sobre la transducció del senyal a sistema nerviós central, en concret a hipotàlem.
3. Discernir quina seria la via de transducció de senyal del tungstat, sabent que és un potent inhibidor de fosfatases i que per tant haurà d'augmentar les activitats cinases involucrades en moltes vies de transducció del senyal.

Objectiu II:

1. Estudiar les diferents vies hipotalàmiques afectades en l'obesitat, comparant hipotàlems d'animals primis i obesos.
2. Buscar noves dianes d'acció del tungstat a SNC, comparant animals primis i obesos tractats i no tractats amb tungstat.

IV. Resultats

*No somiaves belleses impossibles?
No desconfiïs i obre els ulls,
que la terra fa el miracle: una rosa!*

Antoni Correig Massó.

1.- EFECTES DE L'ADMINISTRACIÓ CENTRAL DEL TUNGSTAT DE SODI. ESTUDIS *IN VIVO*.

Per tal de justificar els estudis amb el tungstat a nivell del sistema nerviós central, calia primer de tot veure si aquesta molècula era capaç de passar la barrera hematoencefàlica, i després comprovar que el tungstat tingués efectes centrals directes.

1.1 El tungstat de sodi passa la barrera hematoencefàlica

Tal i com s'especifica a l'apartat de mètodes, per aquest estudi es van utilitzar rates wistar. Quatre d'elles es van utilitzar com a controls, i se'ls va injectar un volum final de 120µl de solució salina per via intraperitoneal (ip). Deu rates van ser injectades amb el volum adequat (segons el pes de cada animal) d'una solució de tungstat 2,8 gr/l per tal d'obtenir una concentració final de 10mg/Kg.

Després de les injeccions es van deixar passar uns intervals de temps compresos entre 30 i 75 minuts abans d'extreure el líquid cefaloraquidi (LCR) als animals. Les mostres es van enviar al laboratori CNRS UMR 5254 de Pau, França, per tal de determinar-ne les tungstèmies mitjançant espectrometria de masses. Com a control positiu es va enviar líquid cefaloraquidi artificial (aLCR) amb tungstat a una concentració final de 185 µg/l. Aquesta mostra control positiu ens va permetre veure que les mesures de detecció eren pràcticament exactes i per tant fiables (l'espectrometria de masses va calcular-ne una concentració de 163 µg/l).

Els resultats de les espectrometries de masses van mostrar clarament que el tungstat passava la barrera hematoencefàlica: en els animals control, els nivells de tungstat eren indetectables, mentre que en les rates tractades es va detectar una mitja de $1,31 \pm 0,07$ mg/l ($3,98$ µM) de tungstat (figura 1). En totes les mostres extretes entre els 30 i els 75 minuts després de les injeccions es van detectar unes concentracions molt semblants de tungstat.

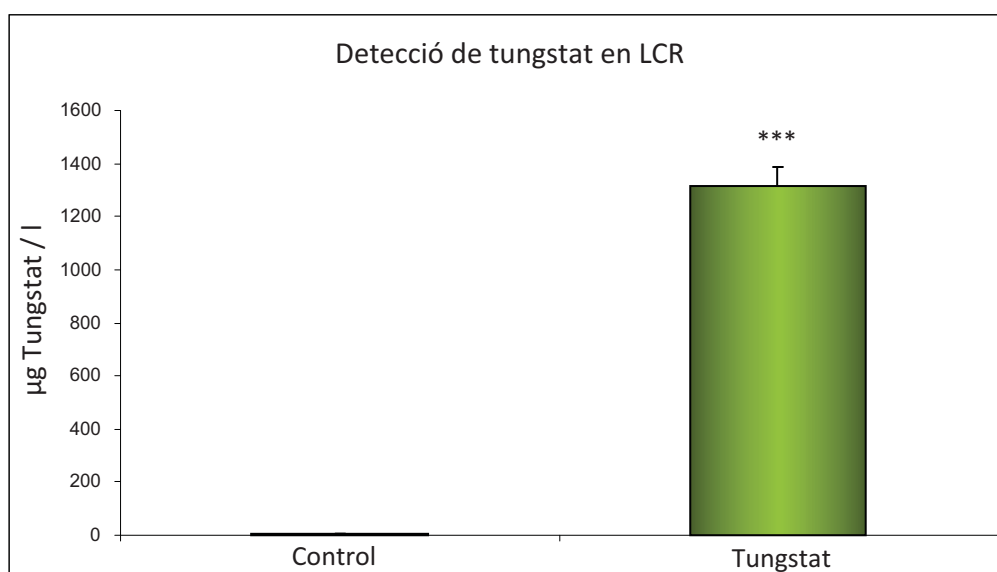


Figura 1. Resultats de la detecció de tungstat en mostres de LCR mitjançant espectrometria de masses. Al gràfic s'hi representa la mitja dels µg de tungstat detectats en les mostres analitzades. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (***) $p \leq 0,001$.

Saber la concentració de tungstat present a LCR també ens va permetre extrapolar una concentració de treball per tal de fer les futures injeccions intracerebroventriculars (ICV), aquesta va ser de $4\mu\text{M}$.

Així doncs, podem afirmar que el tungstat passa la barrera hematoencefàlica sense problemes, i per tant, els estudis de l'efecte del tungstat a nivell de sistema nerviós central estan justificats.

1.2 El tungstat de sodi té efectes directes sobre el sistema nerviós central

Per tal d'estudiar si el tungstat té efectes directes sobre el sistema nerviós central es van fer injeccions de tungstat directes a hipotàlem. Per aquesta part dels estudis es van utilitzar rates wistar, les quals es van dividir en tres grups de treball:

- I. Rates control negatiu, a les quals se'ls va injectar líquid cefaloraquidi artificial (aLCR).
- II. Rates control positiu, a les quals se'ls van injectar $10\mu\text{g}$ de leptina.
- III. Rates tractades amb tungstat, a les quals se'ls van injectar $5\mu\text{g}$ de tungstat.

A tots els animals se'ls va injectar el mateix volum de solució, 4 μ l.

Els primers experiments van consistir en ICV's al tercer ventricle de l'hipotàlem el mateix dia de l'operació, en rates anestesiades i dejunades durant 6 hores, sense implantar cànula. En despertar els animals de l'anestèsia, s'iniciava la presa de mesures de pes corporal i ingesta, controlant aquests paràmetres a les 4 hores, 24 hores i 48 hores. Vam observar que existia una gran variabilitat de resultats, impedit-nos arribar a cap conclusió sobre els efectes del tractament amb tungstat (figura 2).

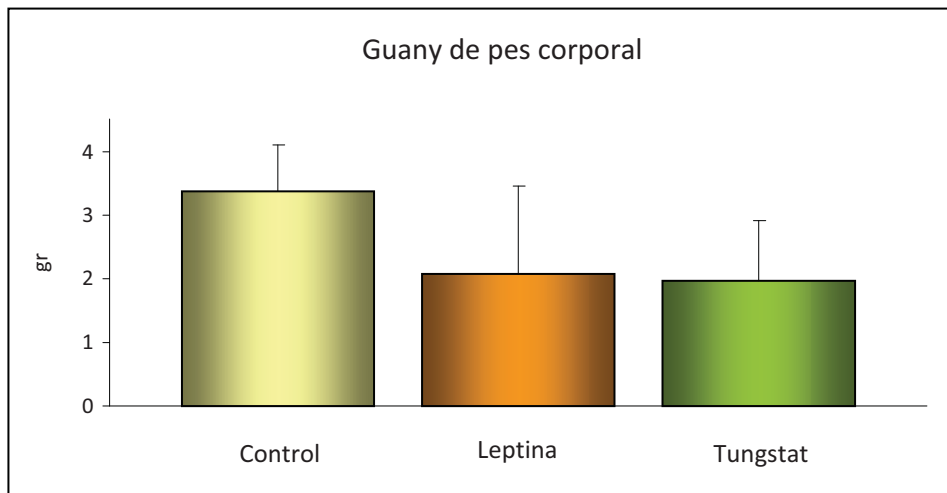


Figura 2. Resultats de les mesures de guany de pes corporal 24 hores després de les injeccions. El gràfic mostra la gran variabilitat de resultats i el gran error estàndard existents.

La hipòtesi del que podia estar passant era que per efecte de l'operació i l'anestèsia, els animals estaven sota unes condicions d'estrès que emmascaraven els possibles efectes tant del tungstat com de la leptina. Vam extreure els hipotàlems després de dur a terme noves operacions i en vam analitzar l'expressió proteica. Es van observar uns nivells de fosforilació de la proteïna ERK 1/2 molt elevats en les tres condicions de treball, fins i tot els animals control (figura 3), confirmant que tots els animals estaven en condicions no aptes per prendre cap tipus de mesures, especialment de pes i ingesta.

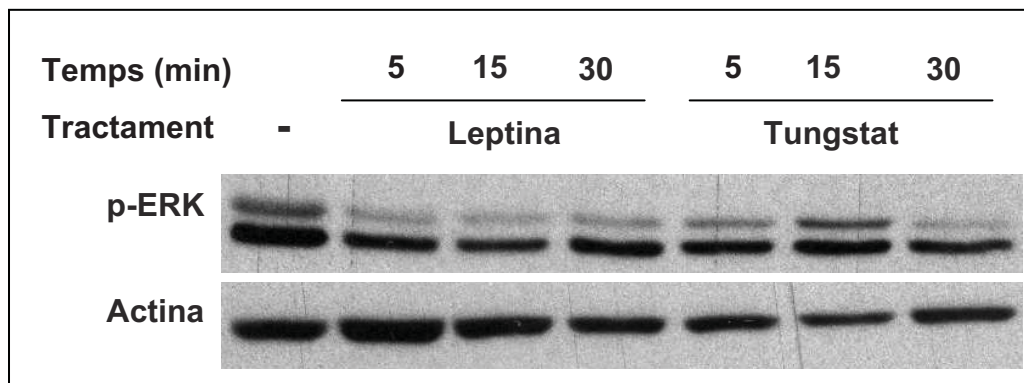


Figura 3. Estudi temporal de fosforilació de la proteïna ERK 1/2 a partir de mostres d'hipotàlem de rata. Els teixits es van extreure 5, 15 i 30 minuts després de les injeccions de leptina (10 μ g) i tungstat (5 μ g). A les rates control se'ls va injectar aLCR.

Per tal de solucionar aquest problema, es van operar animals i se'ls van implantar cànules al tercer ventricle de l'hipotàlem. Es va deixar una setmana de recuperació, i passat aquest temps vam procedir a fer les injeccions en les rates despertes.

Les rates es van dejunar a les 3 de la tarda, i a les 4 es van fer les injeccions. No se'ls va tornar a presentar el menjar fins 4h després de les injeccions, a les 8 del vespre, just a l'inici de la fase fosca. Aquest és el temps zero per a nosaltres, el moment en que les rates reben el menjar. La ingesta i el pes corporal es van monitoritzar a les 12, 24, 36 i 48 hores després del temps zero (figura 4).

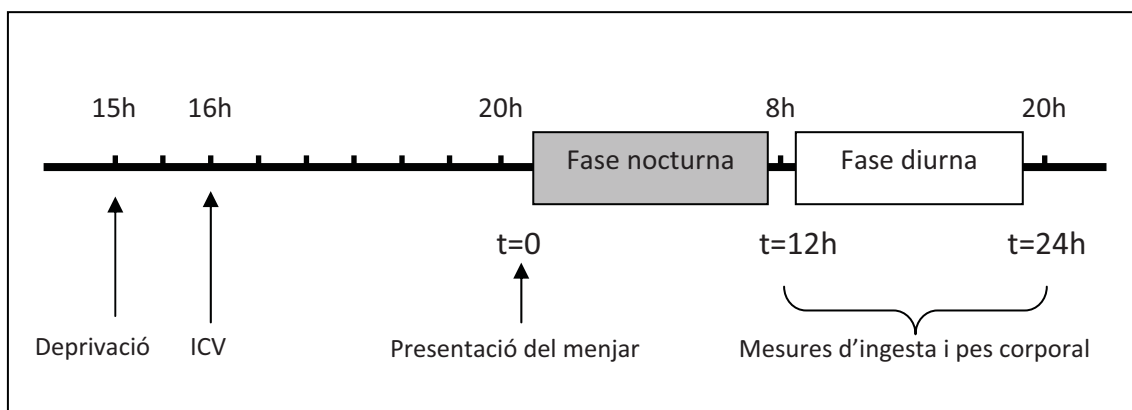


Figura 4. Esquema del procediment dut a terme per realitzar les ICV's i per l'anàlisi del pes corporal i la ingesta després dels tractaments amb leptina i tungstat.

Aquest nou procediment va millorar molt les condicions de l'estudi, reduint la variabilitat entre els grups i entre els animals. Els resultats van mostrar que 24 hores després de la presentació del menjar els animals tractats amb tungstat reduïen el seu guany de pes corporal de forma significativa (una reducció del 61,58% respecte les rates control), un poder semblant al de la leptina (amb una reducció del 54,5%) (figura 5). No es van trobar diferències significatives d'aquest paràmetre 12 o 48 hores després del tractament amb tungstat, però sí amb la leptina, que reduïa el guany de pes de forma significativa fins 48h després de la injecció (dades no mostrades).

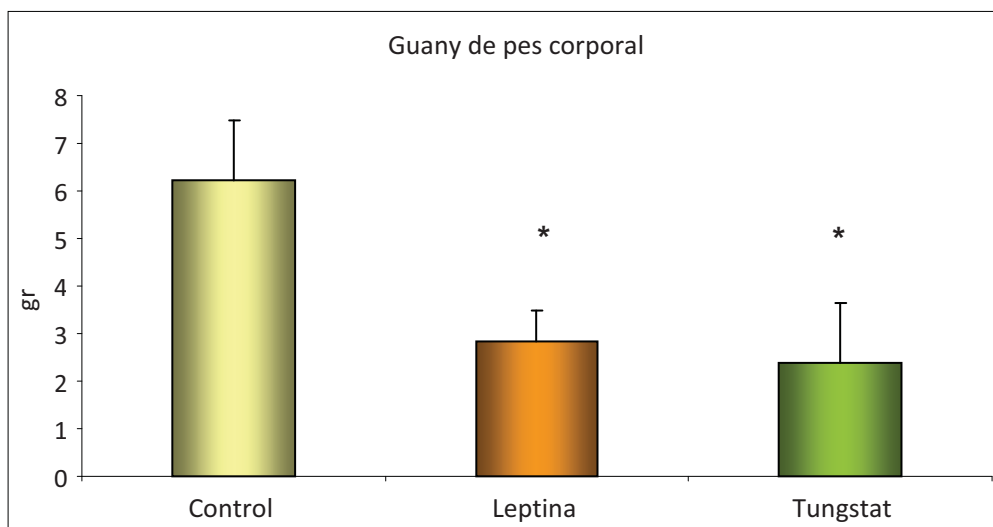


Figura 5: Representació del guany de pes de les rates (gr) 24 hores després de la presentació del menjar. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* $p \leq 0,05$).

El tractament amb tungstat també va reduir la ingesta dels animals 24 hores després de la presentació del menjar, altre cop amb un poder semblant al de la leptina (reduint la ingesta un 14,6% en el cas del tungstat i un 18,2% en la leptina) (figura 6). No es van trobar diferències significatives en els altres temps de tractament analitzats ni en el tractament amb tungstat ni en el de leptina (dades no mostrades).

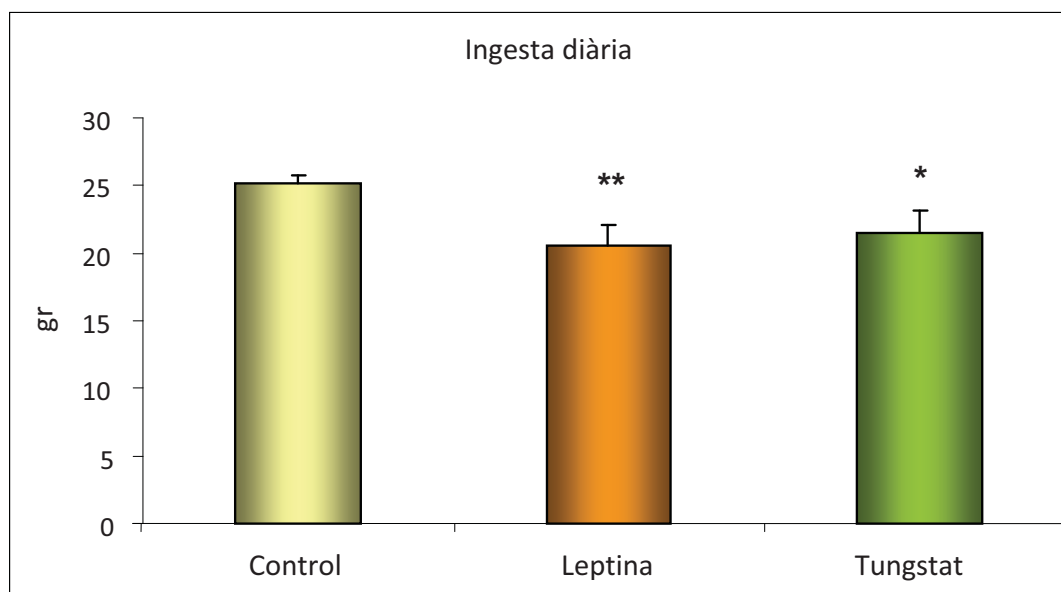


Figura 6. Representació de la ingesta (gr) 24 hores després de la presentació del menjar. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* $p \leq 0,05$ i ** $p \leq 0,01$).

Tenint en compte aquests resultats, podem afirmar que el tungstat té efectes directes sobre l'hipotàlem, donant lloc a una reducció del guany de pes corporal i de la ingesta 24 hores després del tractament, amb un poder comparable al de la leptina.

1.3 El tungstat de sodi activa la via de senyalització de la leptina *in vivo*.

Per verificar que el tungstat és capaç d'activar la via de la leptina *in vivo*, es va analitzar la cascada de senyalització de l'hormona després d'injectar-lo via ICV al tercer ventricle de l'hipotàlem. Com a controls positiu i negatiu es va injectar leptina i aLCR respectivament, utilitzant rates wistar canulades i despertes. Com es mostra en la figura 7, tant la leptina com el tungstat indueixen la fosforilació de JAK2, i en conseqüència, la del residu tirosina de STAT3, indicant que el tungstat activa la via principal de senyalització de la leptina JAK/STAT. Les rates tractades amb leptina o tungstat també activen la fosforilació d'ERK 1/2, Ser-STAT3 i AKT (tot i que en aquest últim cas, el tungstat la fosforila en menor mesura que la leptina) (figura 7).

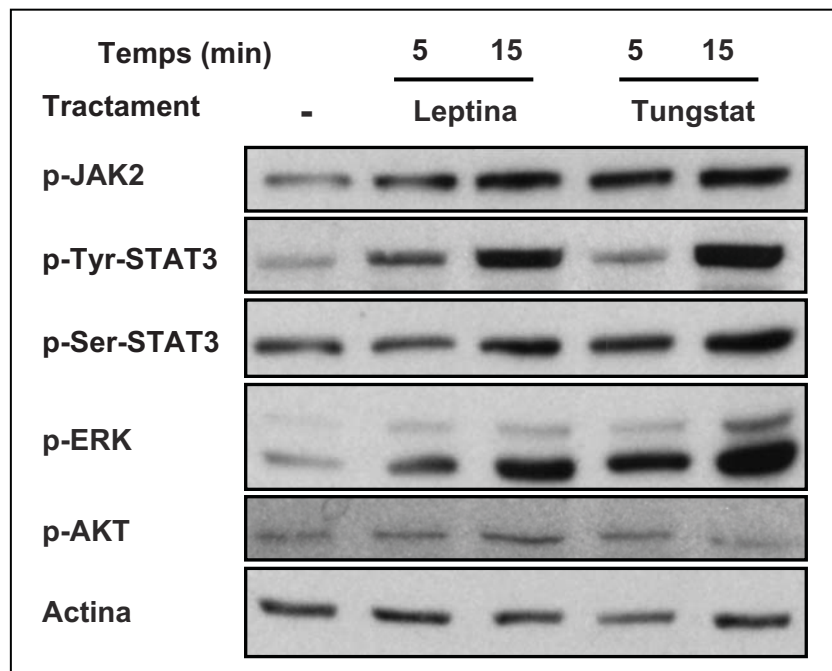


Figura 7. Estudi temporal de fosforilació de la cascada de senyalització de la leptina a partir de mostres d'hipotàlem de rata canulada. Els teixits es van extreure 5 i 15 minuts després de les injeccions de leptina (10 μ g) i tungstat (5 μ g). A les rates control se'ls va injectar aLCR.

Per tant, podem afirmar que el tungstat activa la via de la leptina *in vivo*, i que en aquest sistema actua com una molècula amb efectes mimètics als de la leptina.

2.- DETERMINACIÓ DE LA DIANA MOLECULAR DEL TUNGSTAT DE SODI DINS LA VIA DE LA LEPTINA. ESTUDIS *IN VITRO*.

Per anar més enllà en l'estudi dels mecanismes moleculars de l'acció del tungstat, es van realitzar estudis *in vitro*, utilitzant com a model la línia cel·lular hipotalàmica N29/4.

2.1 Caracterització de la línia cel·lular N29/4

El primer pas a l'hora d'iniciar els experiments amb aquestes cèl·lules era caracteritzar-les, amb la intenció de verificar que expressessin tant les principals proteïnes de la via de la leptina (JAK2, STAT3 i SOCS3), com els neuropèptids anorexigènics característics d'aquesta línia (NPY i AgRP). Els experiments es van fer mitjançant estudis d'expressió gènica per PCR a temps real, i van confirmar l'expressió dels gens d'interès (figura 8). Aquest estudi també ens va permetre veure el temps de cultiu òptim per al treball amb aquestes cèl·lules (moment de màxima expressió dels gens d'interès). Es va escollir treballar al voltant del dia 6 de cultiu (90% confluència).

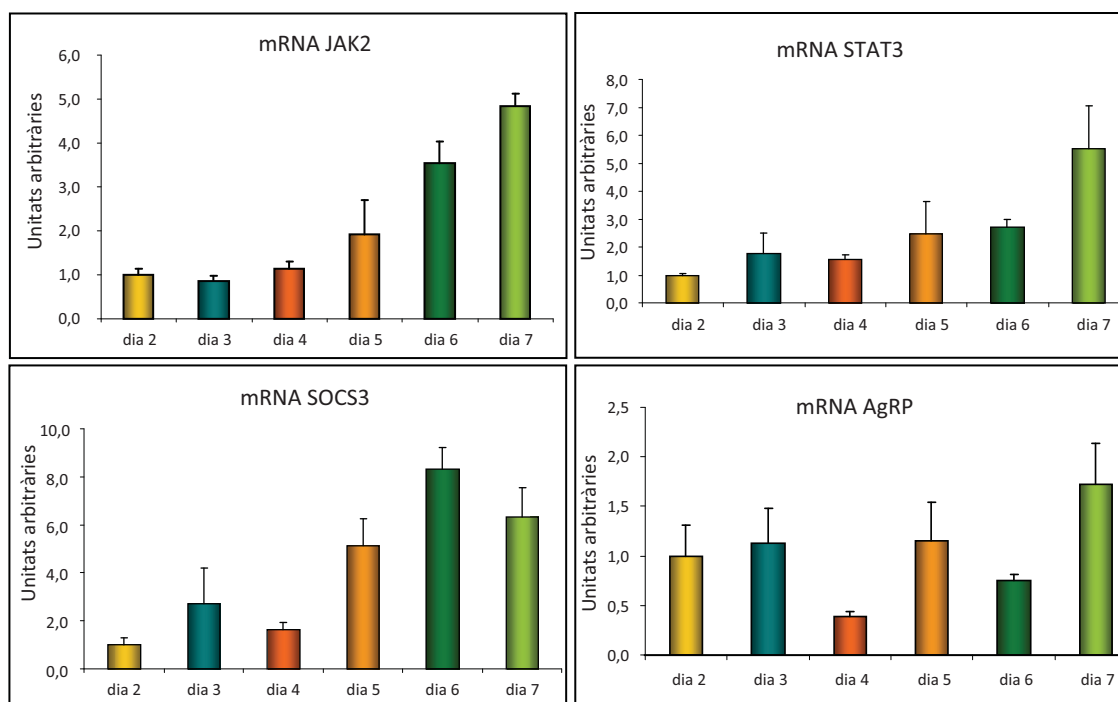


Figura 8. Nivells d'expressió de mRNA en cèl·lules cultivades entre 2 i 7 dies. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana.

El següent tema important a l'hora de posar a punt els treballs *in vitro* era comprovar que aquest model cel·lular responia al tractament amb leptina. Per resoldre aquesta qüestió es van realitzar experiments de dosi/temps-resposta a l'hormona, i es va analitzar la cascada de senyalització de la leptina mitjançant estudis de fosforilació proteica a partir de la tècnica de *western blot*.

Les dosis de leptina testades van ser 1nM, 10nM i 100nM, i els temps de tractament testats van ser de 5, 10 i 15 minuts. Analitzant els resultats de fosforilació del residu tirosina de STAT3 i d'ERK 1/2 com a proteïnes representatives, la dosi d'hormona que va donar més bon resultat va ser 1nM (figura 9), concentració d'hormona mínima que dóna lloc a uns efectes màxims. El temps de tractament amb una resposta màxima van ser els 5 minuts.

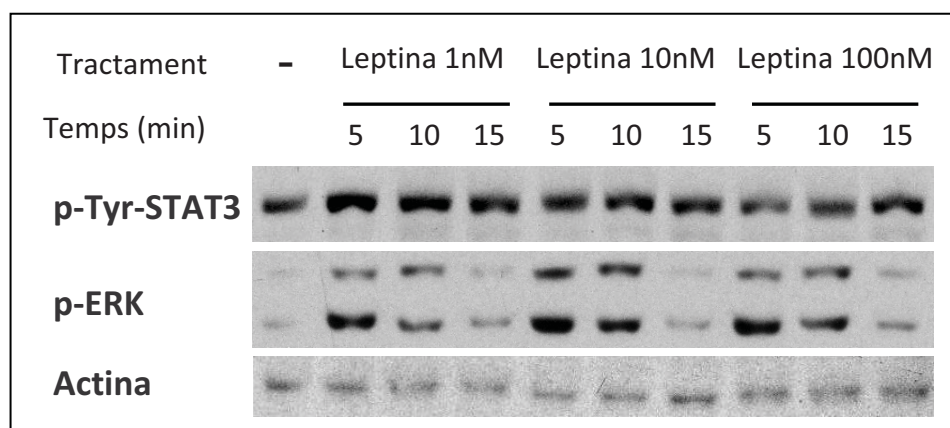


Figura 9. Estudis de dosi/temps-resposta del tractament amb leptina en cèl·lules N29/4. Les dosis de leptina testades van ser de 1nM, 10nM i 100nM, i els temps de tractament testats van ser de 5, 10 i 15 minuts. De les proteïnes extretes se'n va fer un estudi mitjançant western blot, utilitzant com a referència les fosforilacions en Tyr-STAT3 i ERK 1/2.

L'últim punt a provar abans d'iniciar els experiments era veure si calia deprivar o no les cèl·lules de sèrum abans dels tractaments. Tot i que no es coneix exactament la composició dels sèrums, se sap que hi han hormones, i per tant podríem suposar que també hi hagués leptina. Es va decidir, doncs, fer una prova de deprivació per tal de veure si el sèrum en si podria tenir efectes sobre el nostre sistema.

Vam deprivar la meitat de les cèl·lules durant 16 hores, i l'altre meitat no, i després les vam tractar amb leptina durant 5 minuts. Es va analitzar l'estat de fosforilació del residu tirosina de STAT3 com a referència, i vam comprovar que la deprivació alterava els resultats, segurament degut a l'estrès que patien les cèl·lules en aquestes condicions. Les cèl·lules control deprivades mostraven uns nivells de fosforilació molt incrementats respecte el control no deprivat (figura 10).

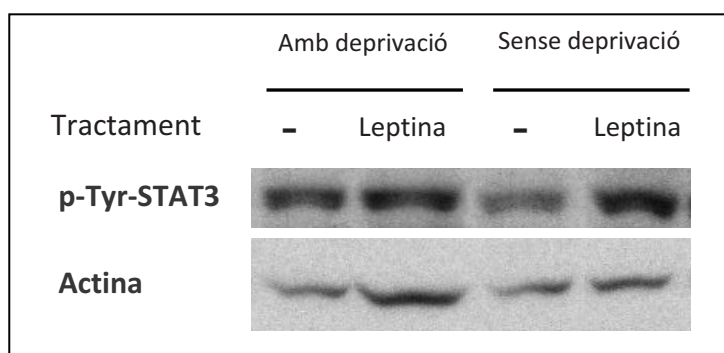


Figura 10. Estudi de les conseqüències de deprivar el cultiu cel·lular a partir de mostres proteiques. Les cèl·lules es van deprivar durant 16 hores o es van mantenir amb sèrum; passat aquest temps es van tractar amb leptina 1nM durant 5 minuts. De les proteïnes que se'n van extreure es va realitzar un *western blot* per tal d'analitzar els nivells de fosforilació de Tyr-STAT3 com a proteïna representativa de la via de la leptina.

Com a conclusió de tots els experiments previs a l'estudi, podem dir que:

- 1) La línia cel·lular N29/4 és un bon model *in vitro*, ja que expressa els gens necessaris per als nostres anàlisis.
- 2) Aquest model cel·lular respon correctament a la leptina. El tractament òptim amb aquesta hormona és a 1nM durant 5 minuts.
- 3) Les cèl·lules no s'han de deprivar per realitzar els estudis.

2.2 El tungstat de sodi activa la via de senyalització de la leptina *in vitro*

El primer punt a tenir en compte per seguir amb aquests estudis era veure si les cèl·lules responien al tractament amb tungstat. Per comprovar-ho, es va realitzar un test de dosi/temps-resposta al tungstat, prenent com a referència les concentracions de tungstat utilitzades en altres estudis [246, 256]. Les dosis que es van testar van ser a 100 μ M i 500 μ M.

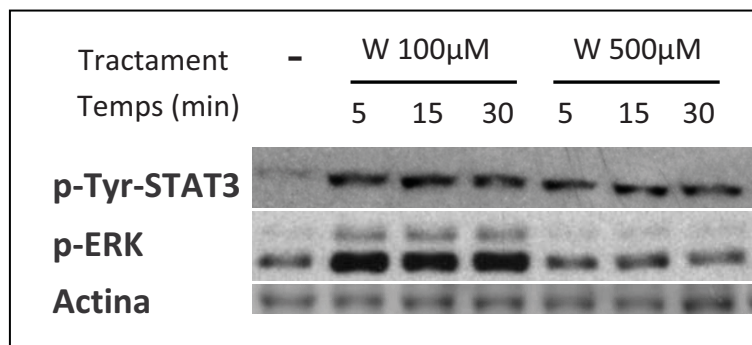


Figura 11. Estudis de dosi/temps resposta del tractament amb tungstat (W) en cèl·lules N29/4. Les dosis testades van ser de 100 i 500 μ M, i els temps de 5, 15 i 30 minuts. De les proteïnes extretes se'n va analitzar la fosforilació de Tyr-STAT3 i ERK 1/2 com a proteïnes representatives de l'activació de la via de la leptina.

Els resultats obtinguts (figura 11) van mostrar que el tungstat activa la via de la leptina també *in vitro*, i que la concentració amb efectes màxims va ser la de 100 μ M. Aquesta va ser doncs la dosi de treball escollida per a tots els estudis posteriors.

Sabent doncs que el tungstat activa la via de senyalització de la leptina, vam realitzar un experiment on es van tractar les cèl·lules amb leptina i tungstat, permetent-nos comparar els dos tractaments i els seus efectes dins la cascada de senyalització de la leptina.

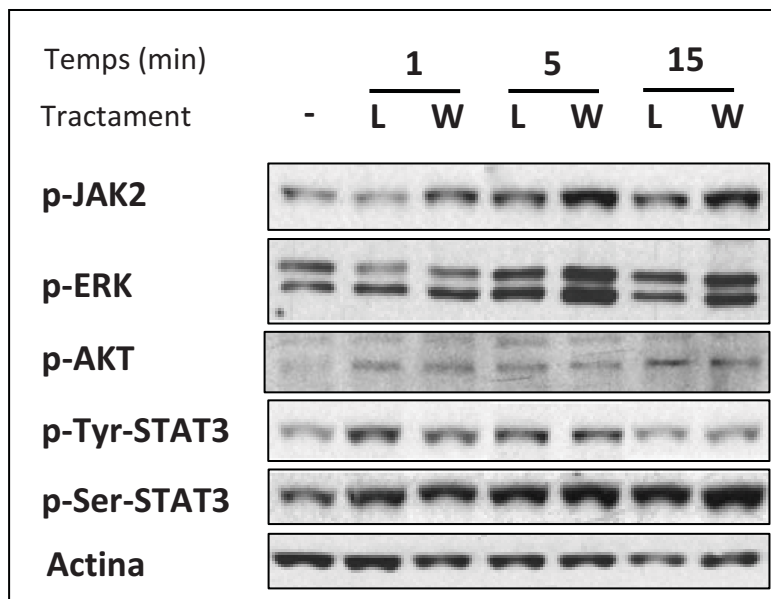


Figura 12. Resultat dels experiments de temps/resposta, tractant les cèl·lules amb leptina (L) 1nM i tungstat (W) 100µM, mitjançant estudis de *Western blot*. Els tems de tractament van ser de 1, 5 i 15 minuts. Els anticossos utilitzats són contra les principals proteïnes de la via de la leptina, estudiant la seva activació a partir dels nivells de fosforilació.

Els resultats (figura 12) van mostrar que el poder d'activació de la via per part del tungstat és similar al de la leptina, en alguns casos fins i tot superior, com en la fosforilació de JAK2 o ERK 1/2. Per tant, tal com passa amb la leptina, el tungstat fosforila (activa) JAK2, ERK 1/2, AKT i els residus tirosina i serina de STAT3.

També ens vam plantejar si afegir o no una condició als nostres experiments, tractant les cèl·lules amb leptina i tungstat a la vegada. Vam realitzar un experiment proteic amb 4 condicions: control, leptina, tungstat i leptina + tungstat. Els resultats van mostrar que la condició leptina + tungstat no variava en cap moment els nivells d'activació de les proteïnes de la via respecte els resultats de la leptina o el tungstat sols, mostrant doncs que en cap moment hi havien efectes additius (figura 13). Per tant, pels futurs experiments es va obviar aquesta condició.

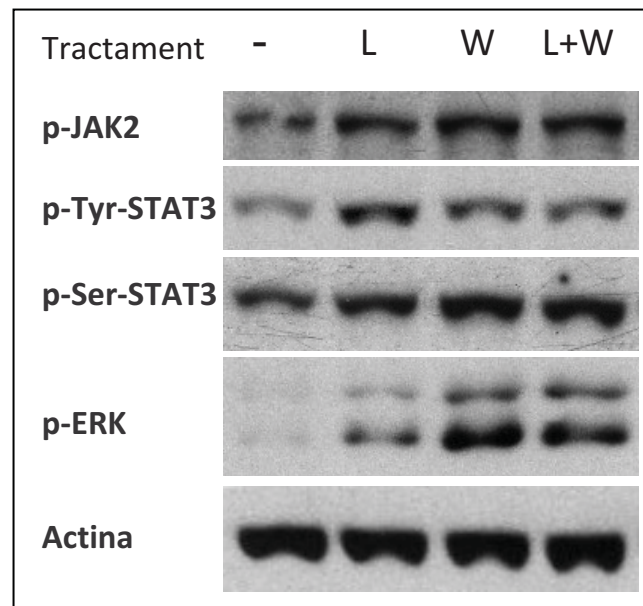


Figura 13. Resultat dels experiments de *Western blot*. Les cèl·lules es van tractar durant 5 minuts amb leptina (L) 1nM, tungstat (W) 100µM i leptina+tungstat (L+W) en les mateixes concentracions. Els anticossos utilitzats són contra les principals proteïnes de la via de la leptina, estudiant la seva activació a partir dels nivells de fosforilació.

Per tant, tenint en compte aquest bloc de resultats podem dir que:

1. El tractament amb tungstat activa la via de senyalització de la leptina *in vitro*, amb uns efectes similars als de l'hormona, però amb una potència major sobre algunes proteïnes.
2. El tractament de les cèl·lules amb leptina i tungstat simultàniament no canvia els resultats front el tractament amb els productes aïllats, i per tant es pot obviar aquesta condició en els futurs experiments.

2.3 El tungstat de sodi regula l'expressió gènica neuronal

El fet que el tungstat estigui estimulant les fosforilacions de la via de la leptina feia suposar que activava la cascada de senyalització, i ho vam comprovar analitzant gens l'expressió dels quals està regulada per aquesta via, com *c-fos*, *c-myc* i els neuropèptids *Agrp* i *Npy*.

A la figura 14 veiem com tant el tractament amb leptina com amb tungstat incrementen l'expressió de l'mRNA de *c-fos* i *c-myc* en només 30 minuts de tractament. En aquest temps, els dos tractaments disminueixen l'expressió d'*Agrp*, efecte observat fins 1 hora després del tractament. L'únic punt on els efectes del tungstat divergeixen dels de la leptina és en la regulació de l'expressió de *Npy*, on el tungstat no hi té cap efecte, mentre que la leptina inhibeix la seva expressió.

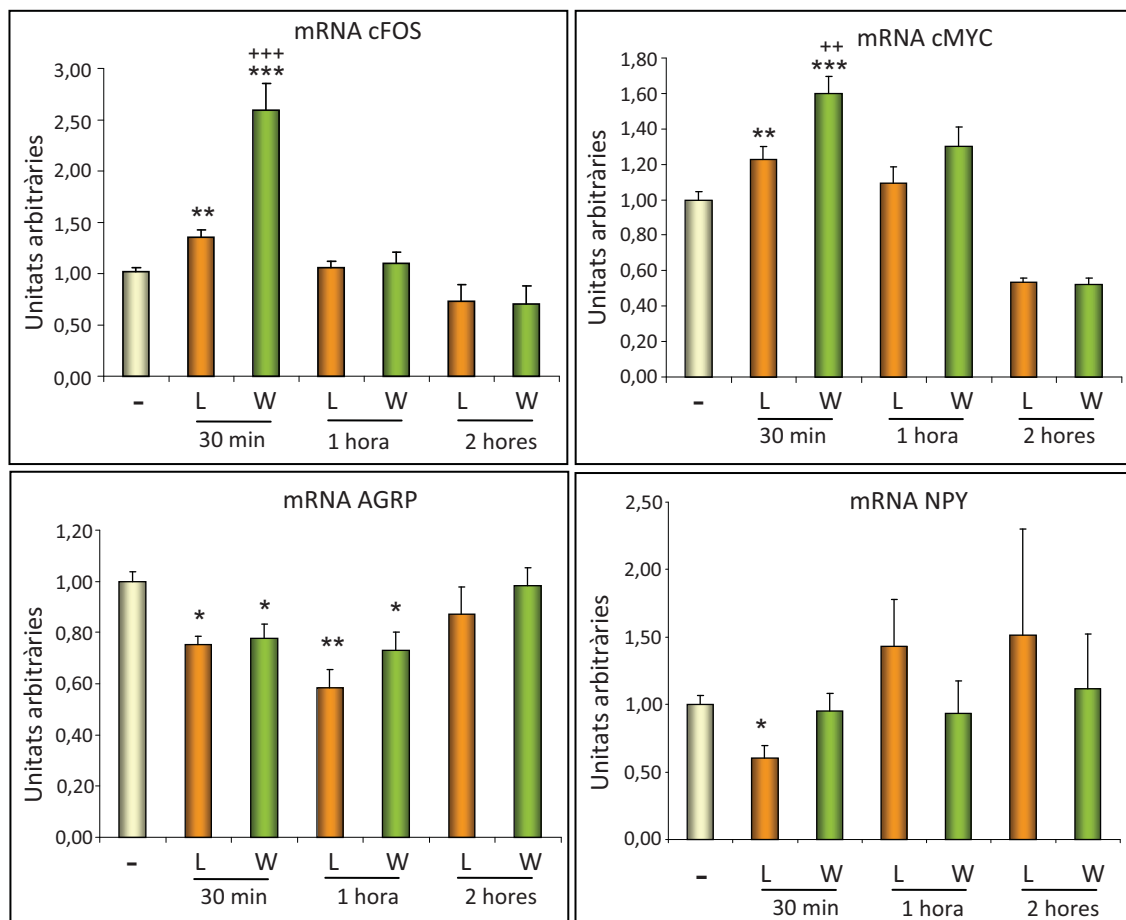


Figura 14. Nivells d'expressió de mRNA en cèl·lules tractades durant 30 minuts, 1 hora i 2 hores amb leptina (L) 1nM o tungstat (W) 100 μ M. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecte les cèl·lules no tractades; + $p \leq 0,05$ respecte el grup leptina 30 minuts).

Així doncs, aquests resultats ens informen que el tractament de les cèl·lules N29/4 amb tungstat incrementa l'expressió gènica de *c-fos* i *c-myc*, i disminueix l'expressió d'*Agrp*, mentre que no té efectes sobre *Npy*.

2.4 El tungstat de sodi actua a través de la via de senyalització de JAK2 i ERK

Un cop confirmat que el tungstat activa la via de la leptina, quedava resoldre la qüestió concreta d'interès: la seva diana molecular dins d'aquesta via.

Per tal de respondre a aquesta qüestió, es van utilitzar inhibidors de diferents proteïnes de la via, per tal de buscar en quin moment el tungstat perdia el seu efecte. La proteïna inhibida seria doncs la seva diana.

2.4.a Bloqueig de la proteïna AKT

Quan es va bloquejar la senyalització d'AKT amb l'inhibidor LY294002 no es van observar canvis en l'acció del tungstat a nivell dels seus efectes sobre les fosforilacions anteriorment descrites: Tyr-STAT3, Ser-STAT3 i ERK 1/2 es seguien fosforilant al mateix nivell que les cèl·lules no tractades amb l'inhibidor (figura 15).

En canvi, l'acció de la leptina després de la inhibició d'AKT es va veure afectada en la seva activitat sobre ERK 1/2 i el residu serina de STAT3.

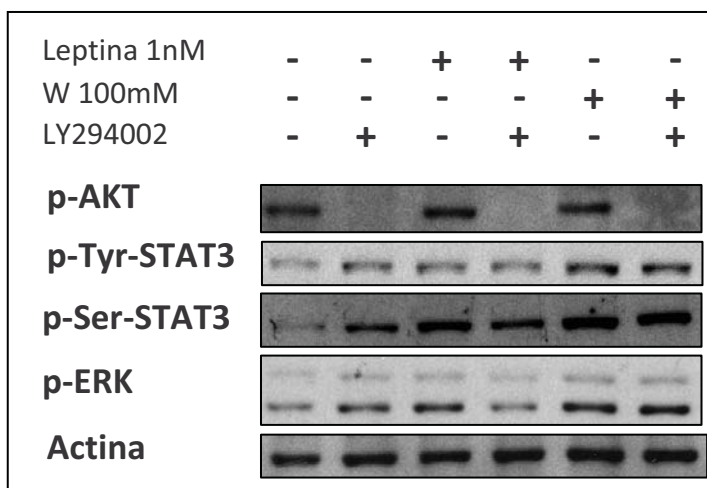


Figura 15. Resultat dels experiments de *western blot*. Les cèl·lules es van tractar durant 1 hora amb l'inhibidor d'AKT LY294002. Passat aquest temps es van tractar durant 5 minuts amb leptina 1nM i tungstat (W) 100µM.

Els resultats d'expressió gènica (figura 16) van mostrar que el bloqueig d'aquesta via no afectava en cap cas a l'efecte del tungstat sobre la regulació gènica, però en canvi sí que afectava a la leptina, perdent els seus efectes sobre *c-fos*, *c-myc* i *AgRP*. La inhibició de la proteïna AKT en cap cas no va donar lloc a alteracions en la regulació de *Npy*.

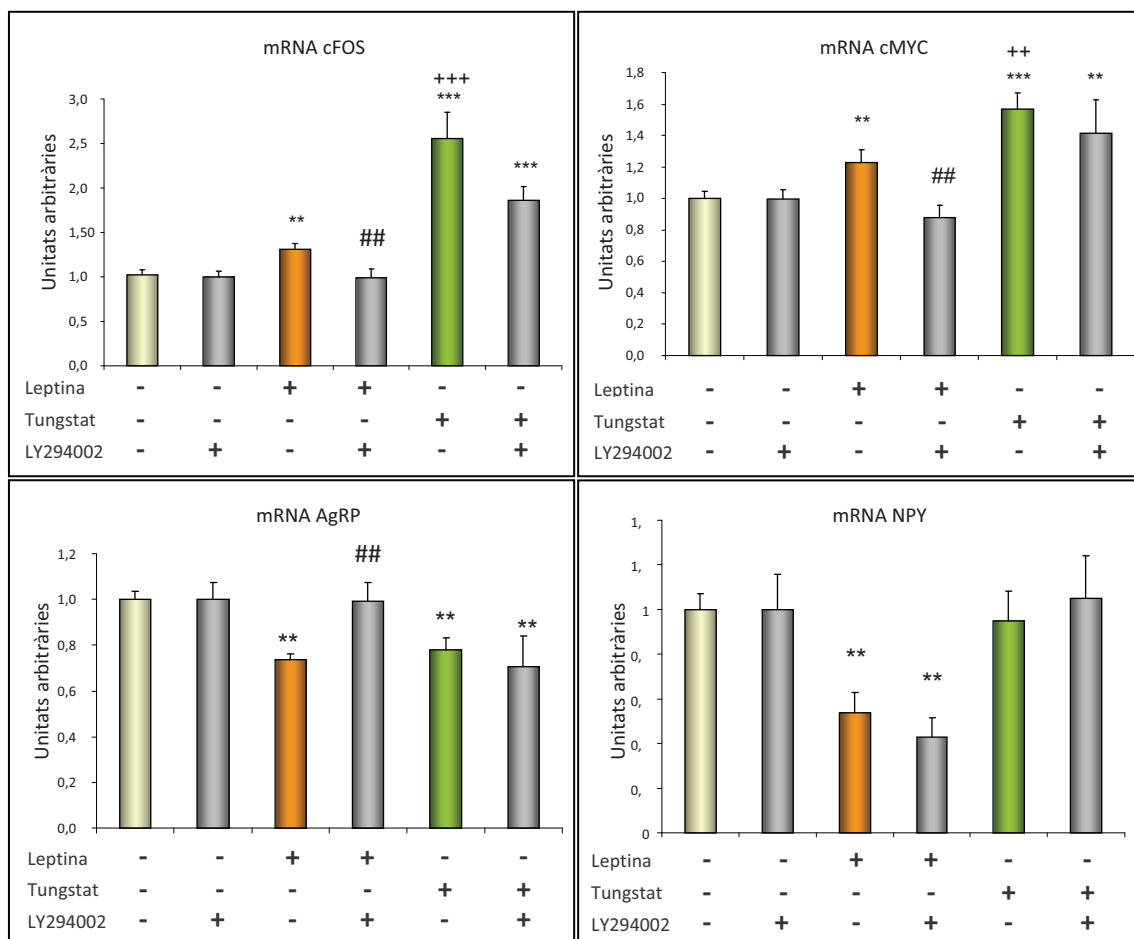


Figura 16. Nivells d'expressió de mRNA en cèl·lules tractades durant 1 hora amb l'inhibidor LY294002, i 30 minuts amb leptina 1nM o tungstat 100µM. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ respecte les cèl·lules no tractades; ++ $p \leq 0,01$; +++ $p \leq 0,001$ respecte el grup leptina; ## $p \leq 0,01$ respecte el mateix tractament però sense inhibidor).

2.4.b Bloqueig de la proteïna JAK2

Quan es va bloquejar la senyalització de la proteïna JAK2 amb l'inhibidor IV, la leptina va veure reduïts tots els seus efectes sobre la fosforilació de proteïnes de la

seva cascada de senyalització (pTyrSTAT3, pERK i pSerSTAT3). En canvi, el tungstat només es va veure afectat en la seva activitat sobre la fosforilació del residu tirosina de STAT3, directament regulada per JAK2. Els seus efectes sobre la fosforilació d'ERK 1/2 i Ser-STAT3 no es van veure afectats. La proteïna AKT no es va veure afectada per cap dels dos tractaments després de la inhibició (figura 17).

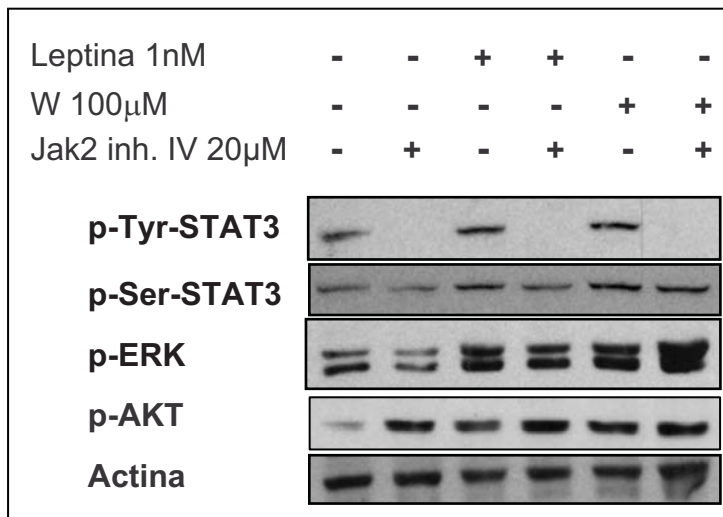


Figura 17. Resultat dels experiments de *western blot*. Les cèl·lules es van tractar durant 2 hores amb l'inhibidor IV de Jak2, i després durant 5 minuts amb leptina 1nM i tungstat (W) 100µM.

Amb aquests resultats vam poder concloure que els efectes del tungstat sobre les fosforilacions d'ERK 1/2 i ser-STAT3 són independents de l'activitat de JAK2.

Quan vam analitzar l'expressió gènica de les cèl·lules després d'aquesta inhibició, vam comprovar que el tungstat seguia incrementant l'expressió de *c-fos*, mentre que la leptina perdia aquesta capacitat (figura 18). Aquest resultat va confirmar que l'efecte del tungstat sobre la proteïna ERK 1/2 (i per tant, sobre cFOS) és totalment independent de la via JAK2 → STAT3.

Tant la leptina com el tungstat van perdre el seu efecte sobre la regulació de l'expressió gènica de *c-myc*. La inhibició de JAK2 no va tenir efectes sobre l'expressió gènica d'*Agrp* en cap dels dos tractaments, mostrant que aquest gen pot estar regulat per una via independent o alternativa a JAK2 (figura 18).

L'ús d'aquest inhibidor tampoc va alterar els resultats sobre l'expressió de *Npy*.

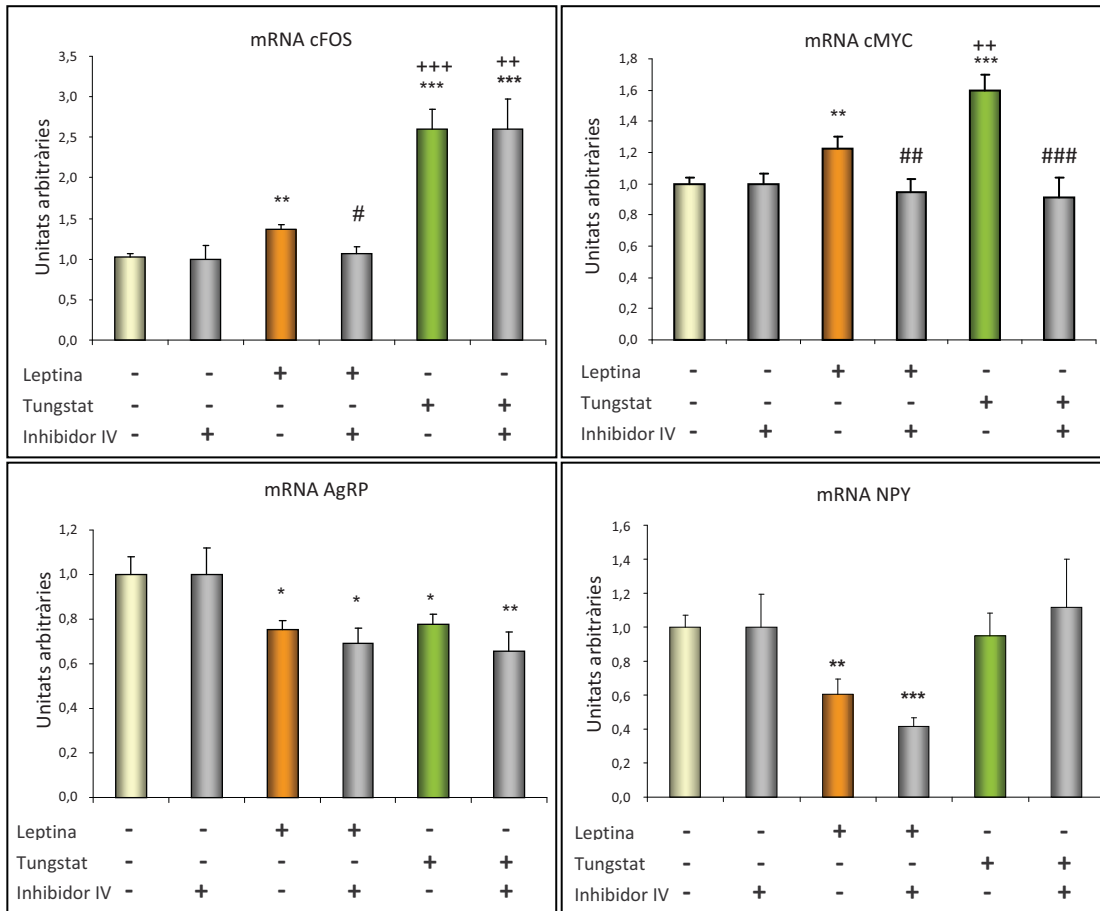


Figura 18. Nivells d'expressió de mRNA en cèl·lules tractades durant 2 hores amb l'inhibidor IV, i 30 minuts amb leptina 1nM o tungstat 100µM. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* p≤0,05; ** p≤0,01; ***p≤0,001 respecte les cèl·lules no tractades; ++ p≤0,01; +++ p≤0,001 respecte el grup leptina; # p≤0,05; ## p≤0,01; ### p≤0,001 respecte el mateix tractament però sense inhibidor).

2.4.b Bloqueig de la proteïna ERK 1/2

Quan es va bloquejar la senyalització d'ERK 1/2 amb l'inhibidor U0126 es va perdre l'acció tant del tungstat com la de la leptina sobre la fosforilació de Ser-STAT3 (figura 19). Ni l'acció sobre la fosforilació de Tyr-STAT3 ni sobre p-AKT es van veure afectades per aquesta inhibició en cap dels dos tractaments.

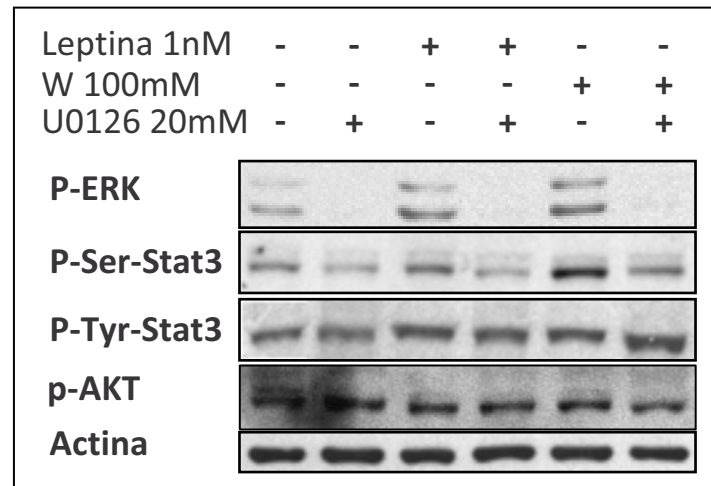


Figura 19. Resultat dels experiments de *western blot*. Les cèl·lules es van tractar durant 1 hora amb l'inhibidor U0126, i després durant 5 minuts amb leptina 1nM i tungstat (W) 100µM.

Amb aquest resultat, a part de confirmar que en el nostre sistema la fosforilació de STAT3 en el seu residu serina està directament regulada per l'acció d'ERK 1/2, també es va confirmar que els efectes del tungstat sobre aquest residu passen per la seva acció sobre la proteïna ERK 1/2.

Analitzant l'expressió gènica després del bloqueig d'aquesta via, es va veure que es perdia completament l'acció de la leptina i del tungstat sobre l'expressió de *c-fos* i *Agpr* (figura 20), mostrant que aquestes accions passen per la via de senyalització d'ERK 1/2; en la regulació de l'expressió de *c-myc* només es va observar una lleugera disminució de l'activitat del tungstat sobre l'expressió d'aquest gen, tot i que l'augment seguia sent estadísticament significatiu. Després d'aquesta inhibició no es van observar canvis en l'expressió de *Npy* (figura 20).

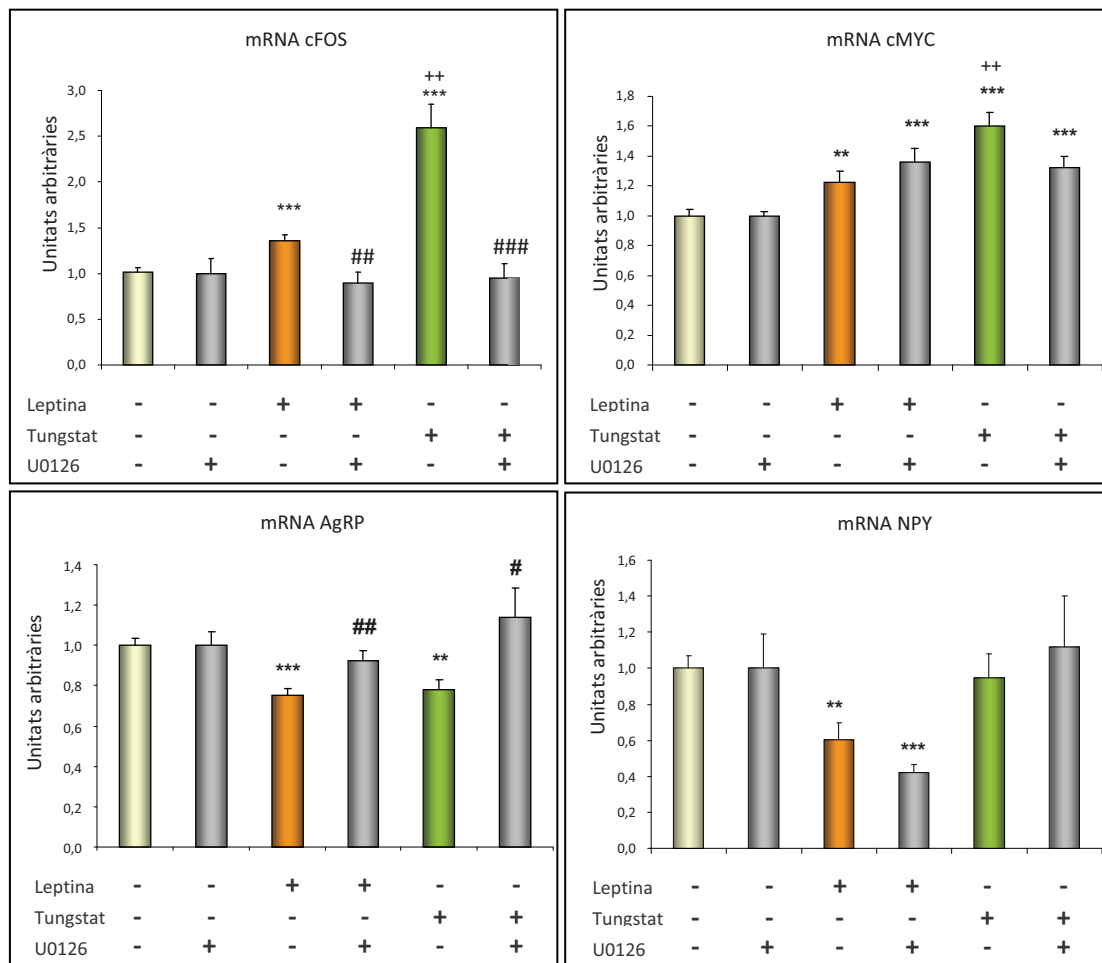


Figura 20. Nivells d’expressió de mRNA en cèl·lules tractades durant 1 hora amb l’inhibidor U0126, i 30 minuts amb leptina (L) 1nM o tungstat (W) 100µM. Les barres d’error representen l’error estàndard de la mitja (** p≤0,01; ***p≤0,001 respecte les cèl·lules no tractades; ++ p≤0,01 respecte el grup leptina; # p≤0,05; ## p≤0,01; ### p≤0,001 respecte el mateix tractament però sense inhibidor).

Per tant, tenint en compte tots aquests resultats podem afirmar que:

1. La inhibició de la via d’AKT no té efectes en l’acció del tungstat sobre les fosforilacions i expressió gènica analitzades.
2. La inhibició de la proteïna JAK2, a nivell proteic, no té efectes sobre l’acció del tungstat en la fosforilació d’ERK 1/2 i Ser-STAT3. A nivell d’expressió gènica, aquesta inhibició només altera la funció del tungstat en la regulació de *c-myc*. Ni *c-fos* ni *Agrp* es veuen afectats.

3. La inhibició de la proteïna ERK 1/2 a nivell proteic no té efectes sobre l'acció del tungstat en la fosforilació de Tyr-STAT3, però sí que bloqueja la seva acció sobre Ser-STAT3. A nivell d'expressió gènica, aquesta inhibició anul·la l'acció del tungstat sobre l'expressió de *c-fos* i *Agrp*.
4. Cap dels inhibidors provats en aquests experiments té efectes sobre l'expressió gènica de *Npy*.

3.- BÚSQUEDA DE NOVES DIANES MOLECULARS DEL TUNGSTAT A HIPOTÀLEM. ESTUDIS PROTEÒMICS.

3.1 Caracterització dels nuclis hipotalàmics ARC, PVN i LHA mitjançant gels 2D-DIGE

El fet de saber que el tungstat podia passar la barrera hematoencefàlica i que tenia efectes directes sobre l'hipotàlem ens va portar a estudiar aquest teixit utilitzant una tècnica d'anàlisi massiu, la proteòmica, amb la intenció de trobar noves dianes d'acció del tungstat. Volent anar encara més enllà, no ens vam limitar a fer l'anàlisi comparant l'hipotàlem total dels animals tractats i no tractats, sinó que vam realitzar un enriquiment dels nuclis hipotalàmics més destacats en el control de l'homeòstasi energètica (ARC, PVN i LHA), per tal de fer la comparació individualitzada de cada un d'ells. Es va aprofitar també per estudiar les diferències en aquests nuclis no només en el tractament amb tungstat, sinó també en l'obesitat, comparant animals prim control i animals obesos.

3.1.a Descripció del model animal utilitzat

Per realitzar aquest anàlisi comparatiu es van utilitzar ratolins c57Bl6, dividits en 4 grups de treball: ratolins prim control (Cn), prim tractats amb tungstat (Cn-W), obesos (Ob), i obesos tractats (Ob-W). La inducció a l'obesitat es va realitzar mitjançant una alimentació rica en greixos durant 4 setmanes prèvies al tractament. Aquesta alimentació es va mantenir durant tot l'experiment. El tractament amb tungstat es va dur a terme mitjançant administració oral, amb una dosi de 2gr/l en l'aigua beguda, durant 2 setmanes.

A l'inici del tractament, els dos grups obesos partien d'un pes corporal significativament augmentat respecte al dels grups prim (complint el criteri d'obesitat: per considerar-se un animal obès, haurà de pesar = mitja pes prim + 2 x desviació estàndard, dades no mostrades). Un cop iniciat el tractament amb tungstat,

els grups tractats mostraven una reducció significativa de guany de pes respecte els seus controls (primos o obesos) des del segon dia de tractament (figura 21), i aquestes diferències es van mantenir al llarg de tot l'experiment. El grup obès tractat mostrava un guany de pes igual al del grup prim control.

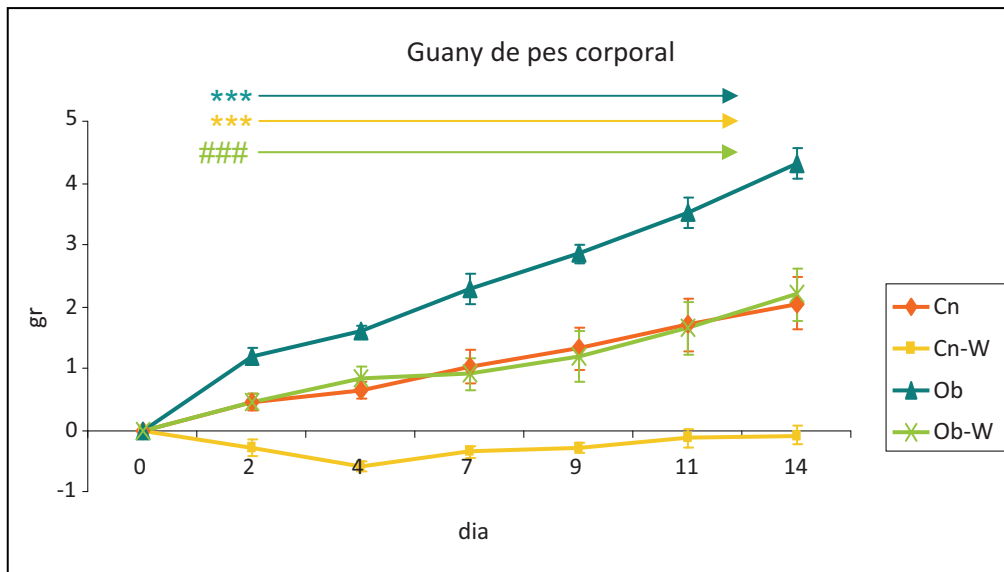


Figura 21. Evolució del guany de pes corporal (gr) al llarg dels 14 dies de tractament amb tungstat. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (***) $p \leq 0,001$ respecte Cn; ### $p \leq 0,001$ respecte Ob).

També es van observar diferències significatives en la ingesta acumulada a partir del quart dia de tractament, que també es van mantenir al llarg de tot l'experiment. Aquestes diferències eren entre el grup obès respecte el prim, i entre els grups tractats respecte els seus controls. Els animals obesos tractats ingerien les mateixes KCal que el grup prim control (figura 22).

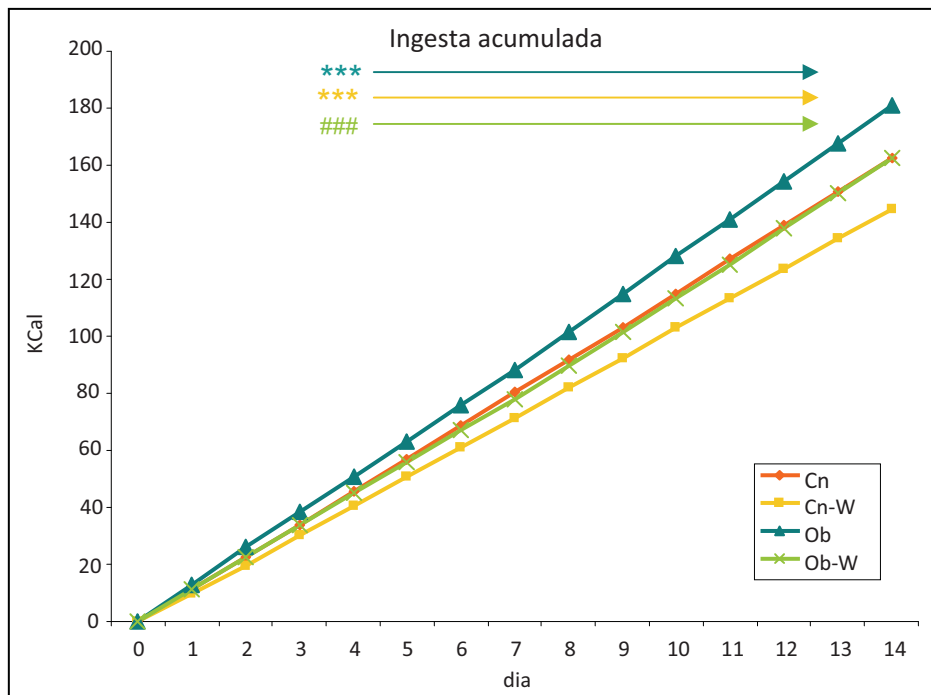


Figura 22. Evolució de la ingesta acumulada (KCal) al llarg dels 14 dies de tractament amb tungstat. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (***) $p \leq 0,001$ respecte Cn; ### $p \leq 0,001$ respecte Ob).

Finalment, com a últim punt de la caracterització del model animal utilitzat, es van prendre mesures de glucosa i triglicèrids en sang abans i després del tractament. Els grups obesos mostraven una glucosa i uns triglicèrids en sang incrementats respecte els grups prims. Finalitzat el tractament, el grup obès tractat amb tungstat mostrava uns nivells de glucosa en sang disminuïts de forma significativa respecte el grup obès (sense arribar a normalitzar-se respecte els animals controls) (figura 23). El tractament va normalitzar els nivells de triglicèrids dels animals obesos tractats amb tungstat respecte els controls (figura 24).

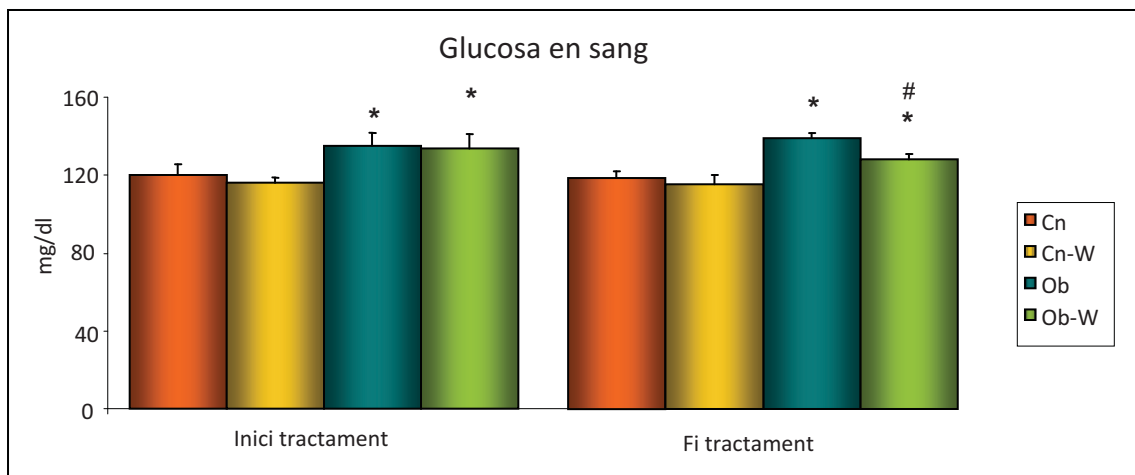


Figura 23. Nivells de glucosa en sang (mg/dl) abans i després del tractament amb tungstat. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* $p \leq 0,05$ respecte Cn; # $p \leq 0,05$ respecte Ob).

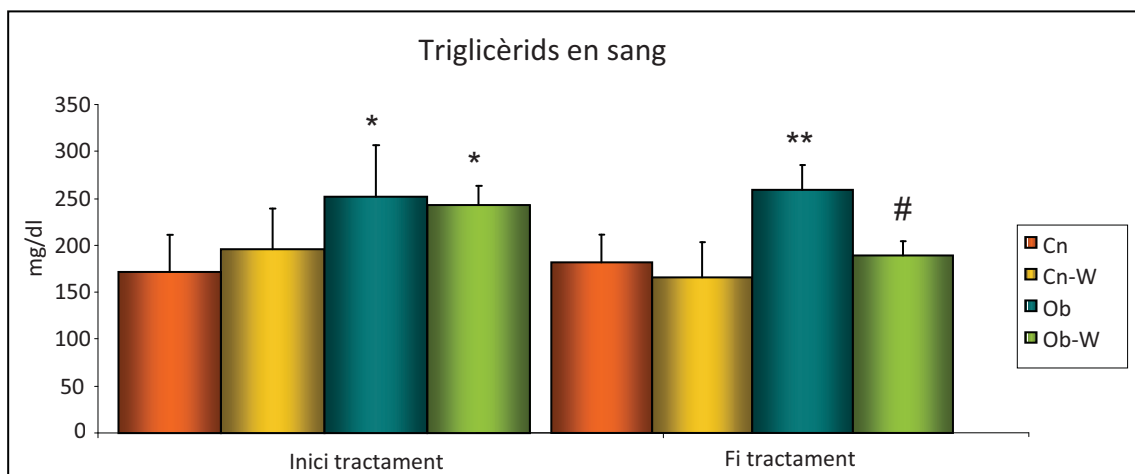


Figura 24. Nivells de triglicèrids en sang (mg/dl) abans i després del tractament amb tungstat. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitja (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ respecte Cn; # $p \leq 0,05$ respecte Ob).

3.1.b Estudi diferencial dels nuclis hipotalàmics ARC, PVN i LHA mitjançant gels 2D-DIGE

Finalitzat el tractament, els animals es van sacrificar i immediatament es va procedir a l'extracció dels hipotàlems i enriquiment dels diferents nuclis. Se'n van extreure les proteïnes i es van preparar i marcar amb Cy3 i Cy5 per tal de realitzar els gels 2D-DIGE.

Per poder comparar diferents gels 2D entre ells, cal que en tots hi hagi un control intern (el mateix per tots els gels) marcat amb Cy2, que ens permeti normalitzar les dades entre els diferents gels, i detectar i corregir problemes de càrrega i d'electroforesi. Amb aquesta finalitat es va utilitzar proteïna extreta d'hipotàlem total de ratolins control. Per minimitzar les variacions del sistema o biològiques, la meitat de les mostres de cada grup es van marcar amb Cy3, i l'altre meitat amb Cy5. El fet que utilitzem 3 fluoròfors vol dir que a cada gel hi podrem carregar 3 mostres diferents a la vegada (dues mostres problema i un control intern). Totes aquestes condicions van donar lloc al disseny experimental mostrat en la taula 1, donant lloc a un total de 8 gels a realitzar, i una n=4 per a cada grup de treball.

Num gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	Ctrl-HT total	Cn 1	Cn-W 1
2	Ctrl-HT total	Ob 1	Ob-W 1
3	Ctrl-HT total	Cn 2	Cn-W 2
4	Ctrl-HT total	Ob-W 2	Cn 2
5	Ctrl-HT total	Cn 3	Ob 3
6	Ctrl-HT total	Cn-W 3	Ob-W 3
7	Ctrl-HT total	Ob 4	Cn 4
8	Ctrl-HT total	Ob-W 4	Cn 4

Taula 1. Esquema del disseny experimental realitzat pel desenvolupament de l'experiment 2D. El mateix disseny s'utilitzà per cada nucli hipotalàmic. ■ Control no tractat (Cn) ■ Control tractat (Cn-W) ■ Obès no tractat (Ob) ■ Obès tractat (Ob-W). Control intern (Ctrl-HT total).

Finalitzades les electroforesis, i un cop havíem adquirit les imatges dels gels 2D mitjançant un escàner de fluorescència (figura 25), es va procedir a l'anàlisi de les taques (*spots*) mitjançant el programa informàtic DeCyder, seleccionant totes aquelles que eren estadísticament diferents entre els grups comparats (figura 26).

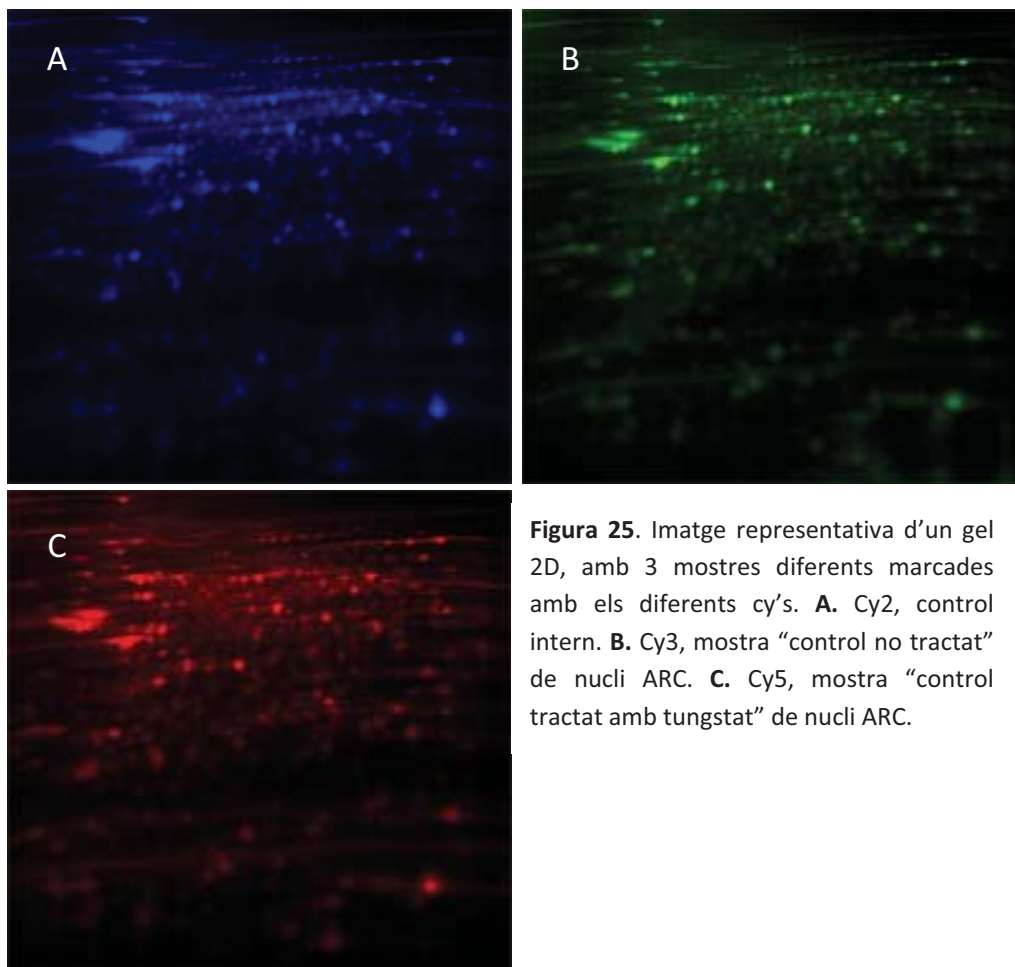


Figura 25. Imatge representativa d'un gel 2D, amb 3 mostres diferents marcades amb els diferents cy's. **A.** Cy2, control intern. **B.** Cy3, mostra "control no tractat" de nucli ARC. **C.** Cy5, mostra "control tractat amb tungstat" de nucli ARC.

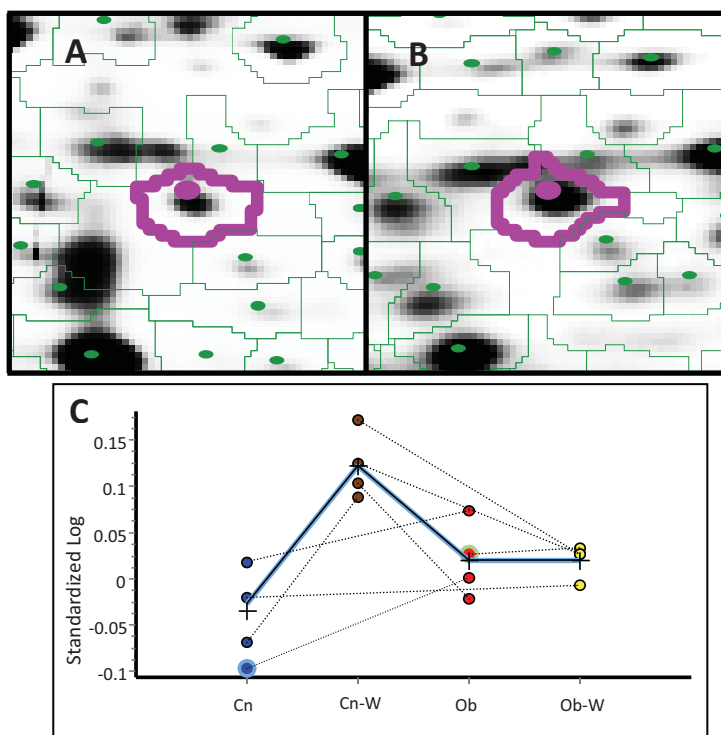


Figura 26. Imatge representativa de l'anàlisi de les taques mitjançant el software DeCyder. **A.** Mostra "control no tractat" de nucli PVN. En lila es marca la taca que s'està analitzant. **B.** Mostra "control tractat amb tungstat". **C.** Gràfic generat pel programa, on en punts de colors s'hi representa la intensitat de la taca en els diferents gels. Les línies puntejades uneixen les 2 mostres que han corregut juntes al mateix gel. La creu és la mitja del grup, i la línia blava esquematitza el perfil de les mitges de cada grup. En aquest exemple veiem com la proteïna augmenta en el grup control tractat (Cn-W) respecte el grup control (Cn), i que el grup obès tractat (Ob-W) no presenta canvis respecte l'obès (Ob).

A la figura 27 s'observen els gels 2D dels tres nuclis hipotalàmics, amb totes les taques seleccionades per ser estadísticament diferents (incrementades o disminuïdes) entre els tractaments, segons el *software* DeCyder. Aquestes taques es van escindir del gel, i les proteïnes es van identificar mitjançant espectrometria de masses.

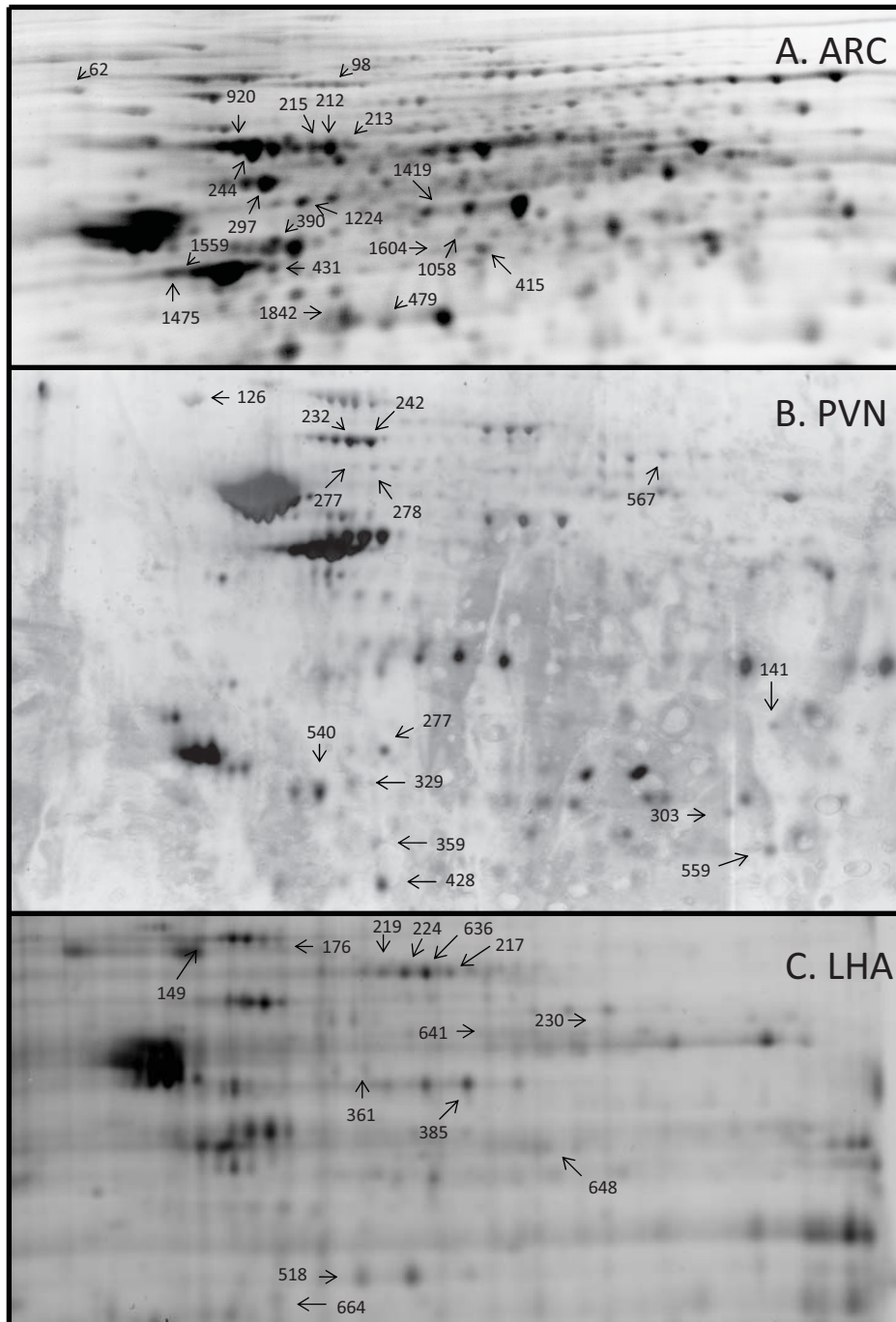


Figura 27. Imatge representativa dels gels 2D, assenyalant les taques significativament diferents entre els grups d'estudi, seleccionats per retallar. **A.** Taques seleccionades del nucli arcuat (ARC). **B.** Taques seleccionades del nucli paraventricular (PVN). **C.** Taques seleccionades de l'àrea lateral hipotalàmica (LHA).

3.3 Identificació de les proteïnes detectades en els estudis comparatius

A la taula 2 s'hi mostren totes les proteïnes identificades mitjançant espectrometria de masses, separades per nucli i per tractament comparat.

NUCLI ARCUAT

Comparació obesos vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
212	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	1,3*	152
390	Q9CZ13	Cytochrome b-c1 complex sub 1, mitochondrial	1,18**	701
920	P63017	Heat shock protein 70 cognate	1,4	604
1842	P16125	Lactate dehydrogenase B	1,42	378

Comparació controls tractats vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
98	P48722	Heat shock 70 kDa protein 4L	1,19*	488
213	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	1,61*	302
215	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	1,34*	69
244	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	-1,19*	74
297	P46660	Alpha-internexin (Neurofilament-66)	-1,8*	1630
415	P14152	Malate dehydrogenase cytoplasmic	-1,21*	64
431	Q04447	Creatin kinase B-type	1,14**	690
479	P14152	Malate dehydrogenase cytoplasmic	1,2*	288
1419	P17182	Enolase 1	1,36*	660
1604	Q9Z2Q6	Septin-5 (Cell division control-related protein 1)	1,33*	222

Comparació obesos tractats vs obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
62	P08553	Neurofilament medium polypeptide	1,5*	624
1224	P62814	Vacuolar H+ATPase B2	1,61*	357
	P68369	Alpha-tubulin-1A chain		214
	Q8BKZ9	Piruvate dehydrogenase, mitochondrial		121
1475	P60710	Beta-actin	1,21*	454
	Q04447	Creatin kinase B-type		169
	P03995	Glial fibrillary acidic protein (Gfap)		153
1058	Q8BXF8	Actin-related protein 1 homolog B	-1,21*	412
	P31938	MEK 1		128
1559	P60710	Beta-actin	1,63*	159

NUCLI PARAVENTRICULAR

Comparació obesos vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
126	Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,83*	224
232	P63017	Heat shock protein 70 cognate	1,19	127
359	Q00623	Apolipoprotein A-I	1,21**	310
428	Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	1,51**	408

Comparació controls tractats vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
141	P50518	V-type proton ATPase subunit E 1	-1,17*	373
242	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	1,34*	324
	P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A		241
277	Q9DCT2	NADH deshidrogenasa, mitocondrial	1,72*	282
329	Q00623	Apolipoproteïna A-I	1,32*	92
	Q9DCT2	NADH dehidrogenase iron-sulfur protein 3		82
	P70202	Latexin		74

Comparació obesos tractats vs obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
232	P63017	Heat shock protein 70 cognate	1,4	127
278	P46660	Alpha-internexin (Neurofilament-66)	-1,1*	964
303	P17751	Triosephosphate isomerase	-1,82*	572
359	Q00623	Apolipoprotein A-I	-1,6**	310
428	Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	-1,77**	408
540	P61982	14-3-3 protein gamma	1,16*	553
559	P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitocondrial	-1,21*	234
567	Q811J3	Aconitase 2, mitocondrial	-1,77*	466

ÀREA LATERAL HIPOTALÀMICA

Comparació obesos vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
641	Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	1,9**	496

Comparació controls tractats vs controls

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
149	P63017	Heat shock protein 70 cognate	-1,51*	753
217	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	-1,32	463
219	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	-1,41*	553
224	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	-1,61**	613
361	P21550	Enolase 3	-1,21*	55
385	P17182	Enolase 1	-1,41	825
518	P14152	Malate dehidrogenase cytoplasmic	-1,21*	245
636	A2AQ07	Tubulin beta1	-1,81*	71
664	P62880	Guanine nucleotide binding protein beta 2	-1,42*	431
	Q9D051	Pyruvate dehidrogenase E1 beta		251

Comparació obesos tractats vs obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Ràtio	Puntuació
176	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	1,19	382
230	P52480	Pyruvate kinase	1,43*	429
648	P15105	Glutamine synthetase	1,61	234
	P35486	Pyruvate dehydrogenase E1, mitochondrial		93

Taula 2. Llista de les proteïnes identificades mitjançant espectrometria de masses dels tres nuclis hipotalàmics analitzats. La primera columna correspon al número de taca assignat durant l'anàlisi amb el software DeCyder. La segona columna correspon al número d'accés de la base de dades UniProt. La tercera columna correspon al nom de la proteïna. La quarta columna al ràtio respecte el seu control (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). Finalment, la cinquena columna correspon a la puntuació que rep la identificació de la mostra. Aquesta puntuació és atorgada pel motor de búsqueda MASCOT. No es considera una bona identificació tota aquella que no superi una puntuació ≥ 60 . En color blau es representen les proteïnes involucrades en creixement axonal, plasticitat i estructura neuronal. En groc, proteïnes involucrades en el metabolisme de la glucosa. En algun cas per a una mateixa taca s'han donat 2 o 3 identificacions. Quan apareix més d'una proteïna identificada per cada taca vol dir que no s'ha pogut detectar quina és la correcta, i per tant s'han tingut en compte totes les opcions.

Els anàlisis dels resultats dels experiments de proteòmica es van iniciar estudiant la funció de cada una de les proteïnes identificades. Això ens va permetre veure que gran part de les proteïnes identificades es podien classificar en dues grans funcions: el metabolisme de la glucosa (s'ha descrit àmpliament el paper que juga el tungstat en aquest aspecte [238, 239, 241, 264, 265]) (taula 2, proteïnes en groc), i el creixement axonal i plasticitat neuronal (taula 2, proteïnes en blau). Aquesta darrera funció del tungstat era completament nova, i és la que ens va cridar més l'atenció. És aquí on vam centrar els nostres estudis.

Com es pot comprovar a la taula 2, es van identificar varies proteïnes de la família dels neurofilaments: *Alpha-internexin (Neurofilament-66)*, *Neurofilament medium polypeptide* i *Glial fibrillary acidic protein (Gfap)*. Aquestes proteïnes són el component majoritari dels axons mielinitzats, i són importants en el manteniment de l'estructura neuronal [266-268]. Mitjançant el programa informàtic *Ingenuity Pathways* (el qual permet, a partir d'un llistat de proteïnes determinat per l'usuari, buscar relacions entre elles amb la finalitat de crear una xarxa que les connecti) (figura 28), i estudiant la bibliografia, vam veure que aquesta família de proteïnes està

regulada directament per les proteïnes ERK 1/2 i STAT3 [266, 268-270]. Com s'ha demostrat en la primera part de la tesi, el tungstat activa directament aquestes dues proteïnes tan *in vivo* (figura 7) com *in vitro* (figura 12), i això donaria suport al fet que el tractament de ratolins amb tungstat pogués alterar la funció o expressió d'aquesta família de proteïnes per finalment regular la plasticitat neuronal i/o el creixement axonal.

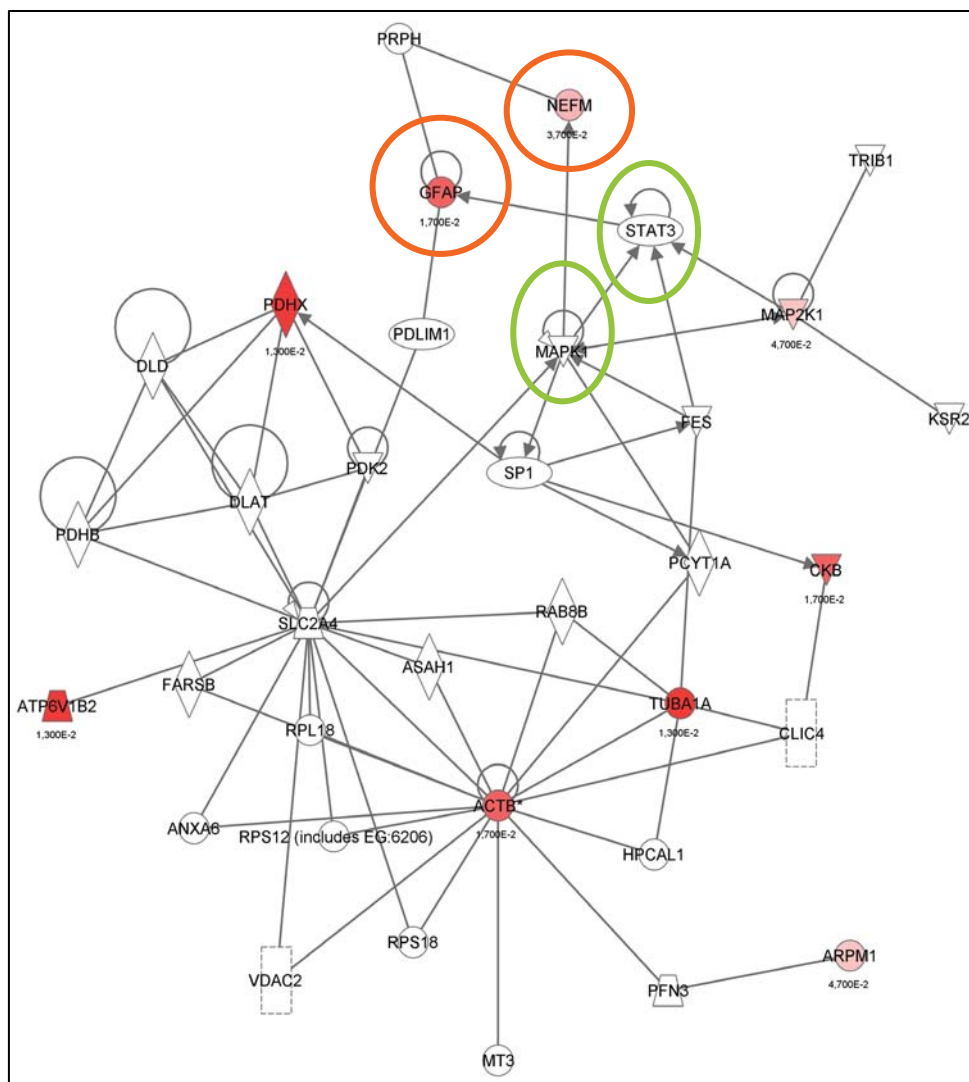


Figura 28. Network o xarxa generada pel programa informàtic *Ingenuity pathways*. Aquest software permet, a partir d'un llistat de proteïnes determinat per l'usuari, buscar relacions entre elles, o entre proteïnes noves directament relacionades, amb la finalitat de crear una xarxa que les connecti. En introduir el llistat de proteïnes obtingudes a partir de l'anàlisi del nucli ARC dels animals Ob vs Ob-W, el programa va generar aquesta xarxa de relacions proteiques. Les proteïnes pintades de vermell són les que hem introduït nosaltres. La intensitat de color representa la significància estadística de la mostra. Les proteïnes sense color no apareixen en els resultats de proteòmica, però estan directament relacionades amb les nostres proteïnes identificades. Els cercles taronges remarquen les proteïnes de la família dels neurofilaments, i els verds les proteïnes que les regulen directament, ERK 1/2 i STAT3.

Donant també suport a la teoria que el tungstat podria estar alterant el creixement axonal i/o la plasticitat neuronal, la proteïna Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2) apareixia alterada en pràcticament tots els nuclis hipotalàmics, en diferents condicions de tractaments (taula 4). Aquesta proteïna s'uneix als heterodímers de tubulina per promoure i permetre l'acoblament (creixement) dels microtúbuls i la remodelització del citoesquelet [271-273]. Estudiant la bibliografia vam veure que aquesta proteïna està regulada per les proteïnes ERK 1/2 i GSK3 β [272, 273], ambdues proteïnes modulades pel tractament amb tungstat [246, 274, 275].

Ulip2	ARC	PVN	LHA
Ob vs Cn	↑		
Cn-W vs Cn	↑↑↓	↑	↓↓↓
Ob-W vs Ob			↑

Taula 4. Classificació de les taques detectades als gels 2D corresponents a la proteïna Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2). Les fletxes indiquen si aquella taca concreta està incrementada o reduïda respecte cada control (cada fletxa correspon a una taca independent).

Observant els gels 2D dels diferents nuclis hipotalàmics vam veure que totes les proteïnes Ulip2 detectades corresponien a taques diferents (figura 29), i això suggereix que existeixen múltiples modificacions post-traduccionals regulades pel tractament.

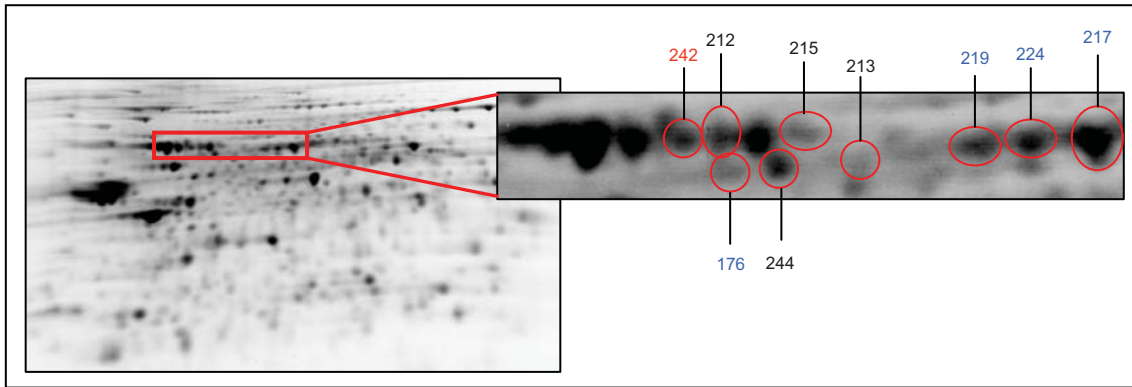


Figura 29. Representació de totes les taques de la proteïna Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2) detectades en els diferents gels. En negre = ARC; blau = LHA; vermell = PVN.

Aquest fet es va corroborar estudiant la bibliografia: Ulip2 es pot fosforilar en múltiples residus, 15 descrits fins ara (figura 30), 7 dels quals se n'ha estudiat la seva regulació: Tyr479, Thr509, Thr514, Ser518 (fosforilació regulada per GSK3 β) [273, 276, 277], Ser522 (fosforilació regulada per la ciclina dependent de cinasa (Cdk5)) [276], Tyr32 (fosforilació regulada per Fyn-tirosina Cinasa) [160] i Thr555 (fosforilació regulada per Rho-Cinasa) [160].

Modification Sites and Domains

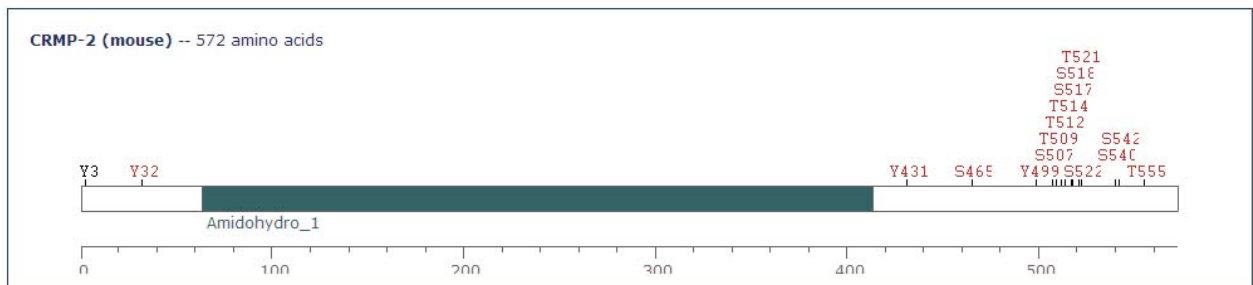


Figura 30. Representació esquemàtica de la proteïna Ulip2 (CRMP-2), on es mostren en vermell totes les possibles fosforilacions descrites fins ara (figura extreta de <http://www.phosphosite.org>)

Per tal de confirmar que, efectivament, les taques identificades per espectrometria de masses corresponien a la proteïna Ulip2, es va fer un altre gel 2D de 7 cm i de rang de pH 4-7, es van transferir les proteïnes a una membrana, i s'hi va passar l'anticòs contra Ulip2 total. La figura 31 mostra que les proteïnes coincidien, i per tant, la identificació feta era correcta.

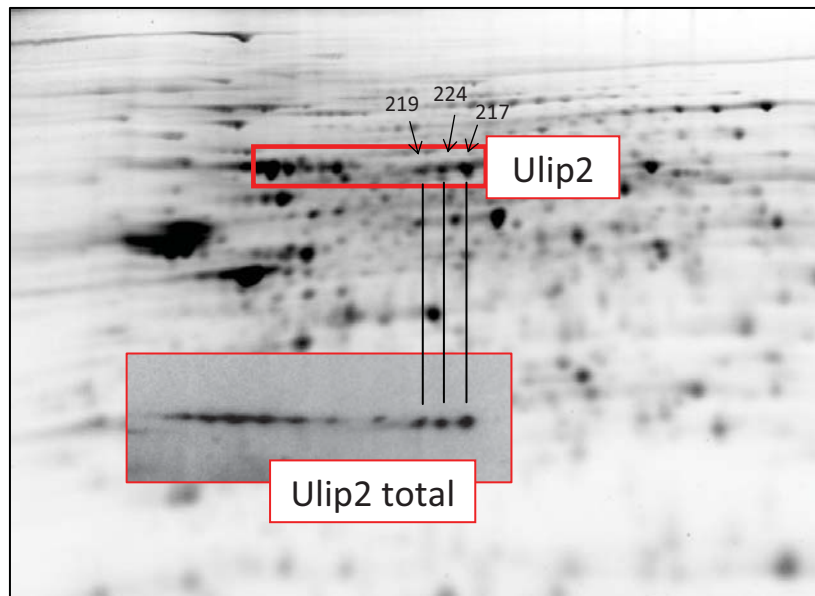


Figura 31. Gel 2D amb les proteïnes Ulip2 identificades per espectrometria de masses marcades amb vermell, i imatge sobreimpresa corresponent a la hibridació amb anticòs Ulip2 total.

Amb aquest últim experiment, tenint les proteïnes transferides a una membrana, volíem aprofitar per intentar identificar les diferents modificacions post-traduccionals que teníem de la proteïna. Al mercat només existeix l'anticòs contra la fosforilació d'Ulip2 en treonina 514, així que la identificació només es va poder reduir a aquesta modificació post-traduccionals.

Els resultats van mostrar que, tal i com s'observa a la figura 32, la fosforilació en Thr514 és present en moltes de les taques obtingudes, i que per tant el canvi en el pI d'Ulip2 (característica que fa situar les taques en diferents posicions sobre l'eix x en els gels 2D) no ha de dependre només d'aquesta fosforilació. Ben al contrari, aquesta gran variabilitat de pI podria demostrar la presència de formes d'Ulip2 hipo o híperfosforilades en diferents residus simultàniament.

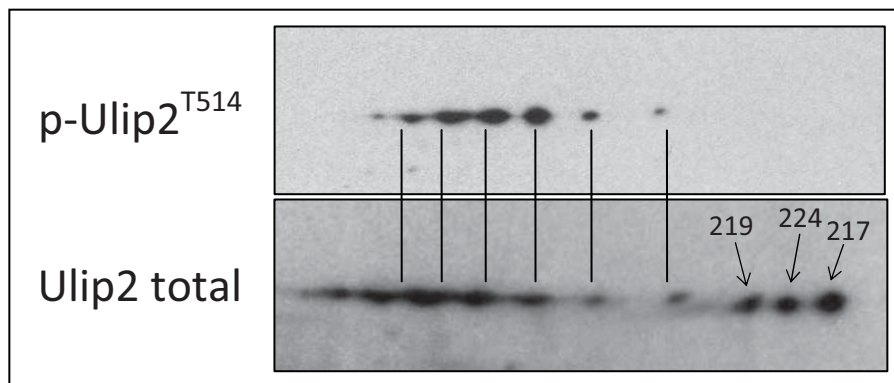


Figura 32. Gel 2D transferit a membrana, i hibridat amb els anticossos p-Ulip2 (fosforilació en treonina 514) i Ulip2 total.

Finalment, el fet que els resultats de l'estudi proteòmic també mostrin alteracions en les proteïnes β -actina, α -tubulina i β -tubulina (taula 2), totes elles proteïnes importants per l'estructura neuronal i axonal, recolzen encara més la hipòtesi que el tungstat podria modular la plasticitat neuronal i el creixement axonal.

V. Discussió

*El remenat d'ous el va inventar un geni
atordit pel fracàs d'una truiteta.*

Jorge Wagensberg.

Objectiu I:

En els resultats publicats pel nostre grup [242], s'ha descrit que el tungstat redueix el guany de pes corporal i l'adipositat en rates amb obesitat induïda amb una dieta hipercalòrica (dieta de cafeteria), sense modificar la ingesta ni provocar alteracions en l'absorció intestinal de lípids, a més de causar una millora en el perfil lipídic. Els canvis observats en l'expressió de gens relacionats amb el transport i l'oxidació d'àcids grassos, i en les proteïnes desacobladores (UCPs) [242, 244, 246], demostren que el mecanisme d'acció del tungstat en la reducció del guany de pes està relacionat amb la modulació de la despesa energètica. No obstant, el fet que l'administració de tungstat en rates primes alimentades amb una dieta estàndard [278] o en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos (model utilitzat en aquesta tesi) provoqui, a més de la reducció de guany de pes, una reducció de la ingesta, implica que els mecanismes d'acció del tungstat també estan relacionats amb el control de la ingesta, i en conseqüència, que el tungstat modula l'homeòstasi energètica dels animals tractats.

La implicació de la leptina en el control de la ingesta i la despesa energètica està àmpliament descrita [105, 106, 115]. També se sap que en individus obesos, els nivells plasmàtics de leptina estan incrementats de forma proporcional a l'increment del seu pes corporal [178, 279], i tot i així, aquestes persones no presenten els efectes esperats de l'hormona sobre la disminució de la gana i l'augment de despesa energètica. En aquests casos es parla de resistència a la leptina [182-184, 187]. El tractament amb tungstat disminueix el guany de pes i la ingesta, tot i reduir els nivells d'expressió de la leptina en teixit adipós blanc [242], així com els nivells circulants de l'hormona (dades no publicades). Aquests efectes del tungstat podrien ser deguts a una millora metabòlica o bé a una sensibilització a l'hormona, permetent que nivells inferiors d'aquesta fossin igual d'efectius.

Un punt destacat en la recerca prèvia, i que ha estat el punt de partida per a determinació dels objectius d'aquesta tesi, ha estat el fet que el tractament de ratolins amb tungstat alterés l'expressió dels principals neuropèptids implicats en l'homeòstasi

energètica [245]. El fet que aquests neuropèptids estiguin regulats principalment per la leptina a nivell de l'hipotàlem, i que aquest teixit sigui una de les principals dianes de l'efecte de l'hormona, va guiar els nostres estudis cap al cervell, per tal de comprovar si el tungstat podia estar actuant al mateix nivell que la leptina.

El tungstat de sodi té efectes directes sobre el sistema nerviós central

Per tal de justificar els estudis sobre l'efecte del tungstat al sistema nerviós central, primer de tot calia saber si el tungstat podia passar la barrera hematoencefàlica. Els resultats obtinguts van demostrar que el tungstat passa la barrera hematoencefàlica sense problemes, i per tant era coherent estudiar els seus efectes sobre aquest teixit.

La següent qüestió important a resoldre per tal de poder seguir amb aquests estudis era veure si el tungstat tenia efectes directes sobre el sistema nerviós central. Amb aquesta finalitat es va injectar el tungstat directament al cervell, concretament al tercer ventricle de l'hipotàlem, i se'n van analitzar els efectes. Injectant directament tungstat al cervell s'obtenien els mateixos efectes ja descrits sobre la reducció del guany de pes i la ingesta, i per tant es podia afirmar que el tungstat té efectes directes sobre el cervell.

Quan es van comparar els animals injectats amb leptina o amb tungstat, es va veure que l'efecte sobre la disminució tan del pes corporal com de la ingesta 24 hores després dels tractaments eren de la mateixa magnitud. És a dir, que el poder d'acció del tungstat sobre aquests paràmetres era comparable al de la leptina.

La diferència entre els dos tractaments apareixia sobre el temps d'acció: mentre que els efectes de la leptina sobre la reducció del guany de pes corporal es mostraven a partir de les 12 hores després de la injecció i durant 48 hores, el tungstat només mostrava efectes 24 hores després del tractament.

Això es pot explicar a partir dels mecanismes d'eliminació dels compostos per part de l'animal:

	Temps de vida mitja	Eliminació	Volum distribució	Referències
Leptina	3,4 h	0,079 l/Kg·h	0,039 l/Kg	[280]
Tungstat	1,7 h	0,19 l/Kg·h	0,46 l/Kg	[281]

Com veiem en aquesta taula, la leptina és activa durant més temps, s'elimina de forma molt més lenta, i el volum de distribució és molt major. Per tant, tenint en compte aquestes dades, el fet que el tungstat tingui efectes més curts que la leptina quan se n'administra una sola dosi, és normal.

El fet que el tungstat tardi més a actuar és més curiós, ja que en els estudis proteics *in vitro* i *in vivo* on s'analitzen les fosforilacions de les diferents proteïnes, els efectes s'observen al mateix moment que la leptina. Aquest fet podria ser degut a la dosi de tungstat administrada. La dosi escollida per fer les injeccions va ser tenint en compte la concentració detectada a LCR, i potser realitzant un test de dosi-resposta (tal com vam fer amb el model *in vitro*) utilitzant concentracions més altes de tungstat haguéssim observat efectes sobre el guany de pes corporal al mateix temps que la leptina.

Els efectes de les dos molècules sobre la ingesta són idèntics, presentant una disminució d'aquest paràmetre només a les 24 hores després del tractament. El fet que la leptina tingui efectes sobre el guany de pes a partir de les 12 hores i fins a 48 hores tot i que a aquest temps l'animal mengi el mateix, podria ser conseqüència dels seus efectes sobre la despesa energètica.

Tots aquests efectes del tungstat podrien ser la conseqüència de la seva acció a nivell molecular: vam observar que el tungstat activava la via de senyalització de la leptina, mostrant uns nivells de fosforilació de les principals proteïnes de la via (JAK2, STAT3, ERK 1/2 i AKT) comparables als de l'hormona. Per tant, teníem nombroses evidències que els efectes del tungstat sobre el guany de pes i la ingesta dels animals passaven a través de la via de la leptina.

El tungstat de sodi activa la via de senyalització de la leptina *in vitro*

Estudis proteics

En els estudis proteics, vam observar que, altre cop, el tungstat tenia pràcticament els mateixos efectes que la leptina. De fet, la capacitat del tungstat per fosforilar JAK2, ERK 1/2 i el residu serina de STAT3 era més potent i més ràpida que la leptina. Per tant, amb aquests resultats vam confirmar que el tungstat, per si sol, tenia els mateixos efectes que la leptina en l'activació de la seva via de senyalització també *in vitro*.

El fet de tractar les cèl·lules amb les dues molècules simultàniament no donava lloc a efectes sumatoris. Això probablement era degut a que el sistema es trobava saturat i no era capaç d'augmentar encara més els nivells de fosforilació.

Estudis d'expressió gènica

Els gens analitzats en aquest estudi estan tots ells regulats de forma directa per una o varies de les proteïnes implicades en la senyalització de la leptina: el gen *c-fos*, regulat directament per la proteïna ERK 1/2 [282-284], *c-myc*, regulat per STAT3 [285, 286]), i *Agrp* i *Npy*, ambdós neuropèptids amb una regulació complexa per part de múltiples proteïnes [170, 287-289].

En les cèl·lules N29/4, el tractament amb tungstat va incrementar l'expressió de *c-fos*, presentant diferències significatives tant respecte les cèl·lules control, com respecte la leptina. En els estudis proteics s'havia vist que el tungstat tenia un poder de fosforilació de la proteïna ERK 1/2 molt més potent que la leptina, podent així explicar el fet que amb aquest tractament, els nivells d'expressió siguin molt més elevats.

Ambdós tractaments van mostrar un augment de l'expressió de *c-myc*, més marcat amb el tractament amb tungstat que amb el de leptina, degut a que el tungstat fosforila el residu serina de STAT3 de forma més potent que la leptina (quan la proteïna STAT3 es troba fosforilada simultàniament en tirosina i serina, és molt més activa que si només està fosforilada en tirosina [147, 149, 150]).

Tant la leptina com el tungstat van disminuir l'expressió d'*Agrp*. L'únic punt on els efectes dels tractaments no coincidien, era sobre la regulació de *Npy*: mentre que la leptina disminuïa la seva expressió, el tungstat no hi tenia cap efecte. Aquest aspecte es discutirà posteriorment.

Estudis amb inhibidors químics

a) Inhibició de la senyalització d'AKT

A nivell de fosforilació proteica, la inhibició de la senyalització de la proteïna AKT no va alterar els efectes del tungstat sobre JAK2, STAT3 o ERK 1/2, mostrant que els seus efectes eren completament independents de la via Pi3K → AKT. Per contra, la leptina va presentar una disminució en la capacitat de fosforilar la proteïna ERK 1/2 indicant una regulació creuada d'aquestes dues cinases, com s'ha descrit en cèl·lules hipotalàmiques [290] i en cèl·lules de ronyó [291].

A nivell d'expressió gènica, la inhibició de la proteïna AKT no va donar lloc a canvis sobre l'acció del tungstat, però sí que va anul·lar l'acció de la leptina sobre *c-fos* (explicat per la pèrdua de fosforilació d'ERK 1/2), *c-myc* (explicat per la disminució de fosforilació del residu tirosina de STAT3 si es compara amb el control + inhibidor) i *Agrp* (gen regulat en part per AKT [170, 292] i per ERK 1/2 [288, 289]).

a) Inhibició de la senyalització de JAK2

A nivell de fosforilació proteica, la inhibició de la senyalització d'aquesta proteïna va donar lloc a la pèrdua dels efectes tant de la leptina com del tungstat sobre la fosforilació del residu tirosina de STAT3. Aquest fet és lògic si tenim en compte que aquesta fosforilació és conseqüència directa de l'acció de JAK2.

El punt interessant va ser que, mentre que la leptina va reduir els seus efectes sobre les fosforilacions d'ERK 1/2 i del residu serina de STAT3 (ja que aquests efectes passen a través de l'activació de JAK2), el tungstat hi va seguir actuant, demostrant que és capaç d'activar la via de senyalització d'ERK 1/2 de forma JAK2-independent.

Tant la leptina com el tungstat van seguir fosforilant la proteïna AKT, mostrant que aquesta acció a les cèl·lules N29/4 és JAK2-independent per les dues molècules.

A nivell d'expressió gènica, els primers resultats importants observats van ser que la inhibició de la proteïna JAK2 anul·lava totalment els efectes de la leptina sobre l'augment d'expressió de *c-fos*, mentre que el tungstat seguia sent igual d'actiu. Aquest fet es relaciona perfectament amb els resultats de l'estudi proteic: la leptina disminuïa la capacitat de fosforilar (d'activar) ERK 1/2, mentre que el tungstat la fosforilava amb la mateixa potència.

Tant la leptina com el tungstat van perdre la capacitat d'augmentar l'expressió de *c-myc*. Altre cop, aquests resultats es relacionen perfectament amb les dades obtingudes dels estudis proteics: aquest gen està regulat de forma directa per STAT3 [285, 286], i després de la inhibició perdíem la fosforilació en tirosina de la proteïna. Aquesta fosforilació és la que permet que STAT3 pugui actuar com a factor de transcripció [139, 147].

Ni la leptina ni el tungstat van perdre els seus efectes sobre la inhibició de l'expressió d'*Agrp*, mostrant que en el nostre sistema, aquest gen no està regulat per STAT3. Estudiant la bibliografia vam observar que la regulació d'aquest gen varia molt segons el sistema utilitzat, podent ser modulada per STAT3 (dades obtingudes a partir d'estudis amb ratolins mutants per aquesta proteïna [287]), per ERK 1/2 (en estudis on s'utilitza en la línia cel·lular neuronal GT1-7 [288] o la línia hipotalàmica mHypoE-46 [289]), o per Pi3K (en estudis amb rates Sprague-Dawley [170, 292]). Per tant, amb això veiem que aquest és un gen amb una regulació complexa, modulada per múltiples proteïnes. En el nostre sistema, la falta de senyalització de JAK2-STAT3 dóna lloc a nivells normals de mRNA d'*Agrp*.

b) Inhibició de la senyalització d'ERK 1/2

A nivell de fosforilació proteica, la inhibició de la senyalització de la proteïna ERK 1/2 va donar lloc als mateixos efectes sobre l'acció de la leptina i del tungstat, perdent la seva capacitat de fosforilar el residu serina de STAT3, tal i com apareix

descriu a la bibliografia [148, 149], però sense modificar el seu residu tirosina, ja que aquest depèn directament de JAK2 [139, 147], tampoc afectat per aquesta inhibició.

A nivell d'expressió gènica vam observar que tan la leptina com el tungstat van perdre la seva acció sobre l'increment d'expressió de *c-fos*, regulada directament per la proteïna ERK 1/2 [282-284].

No es van observar canvis en l'expressió de *c-myc* després d'aquesta inhibició, mostrant que la seva regulació és independent de la proteïna ERK [285, 286].

Sí que es va veure alterada la funció d'ambdós productes sobre l'inhibició d'*Agrp*, mostrant que en el nostre sistema, aquest neuropèptid està regulat per ERK 1/2, tal i com s'ha descrit en diversos estudis [288, 289].

Model d'acció del tungstat

Per tant, tenint en compte tots aquests resultats obtinguts a partir de l'ús dels diferents inhibidors, podem afirmar que el tungstat té efectes a dos punts diferents i independents de la via de la leptina (figura 1): el tungstat activa les vies de senyalització de JAK2 i d'ERK 1/2, de forma independent. Tot i que també s'ha observat una acció directa del tungstat sobre la fosforilació de la proteïna AKT, no se n'ha pogut observar cap efecte derivat, ja que la inhibició d'aquesta proteïna no donava lloc a alteracions en els efectes descrits (figura 1).

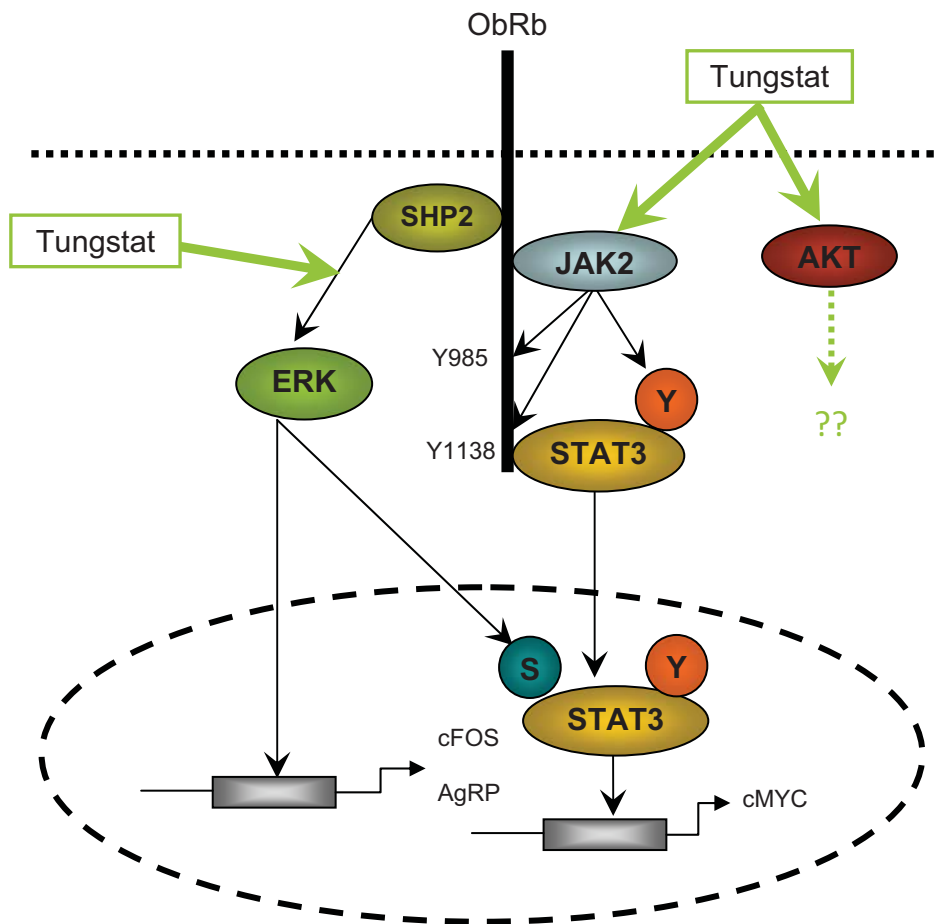


Figura 1. Esquema representatiu de l'acció del tungstat dins la via de la leptina en la línia cel·lular hipotalàmica N29/4. Tot i que la seva acció és via inhibició de fosfatases, aquestes no es mostren a l'esquema per simplificar-lo.

En el nostre sistema, la leptina actua via el seu receptor, fosforilant la proteïna JAK2, i donant lloc així a les seves accions *downstream*: fosforilació del residu tirosina de STAT3, de la proteïna ERK 1/2 i del residu serina de STAT3. Totes aquestes accions van lligades, conseqüència de l'activació de JAK2 (figura 2). En aquest sistema, la leptina està tenint també una acció sobre la fosforilació d'AKT de forma independent a JAK2, ja que quan inhibim aquesta proteïna, la leptina segueix sent capaç de fosforilar AKT (línia discontinua de l'esquema, figura 2). Aquest fet s'ha observat en algun altre sistema [293], i podria ser conseqüència de l'activació directa del receptor de la insulina per part de la leptina (leptina → IRS2 → AKT). En les nostres cèl·lules, s'observa també una relació creuada entre AKT i ERK 1/2, donant lloc a un augment de

la fosforilació de la proteïna ERK 1/2 per part d'AKT [290, 291] que explicaria els efectes observats sobre l'expressió d'*Agrp* (figura 2).

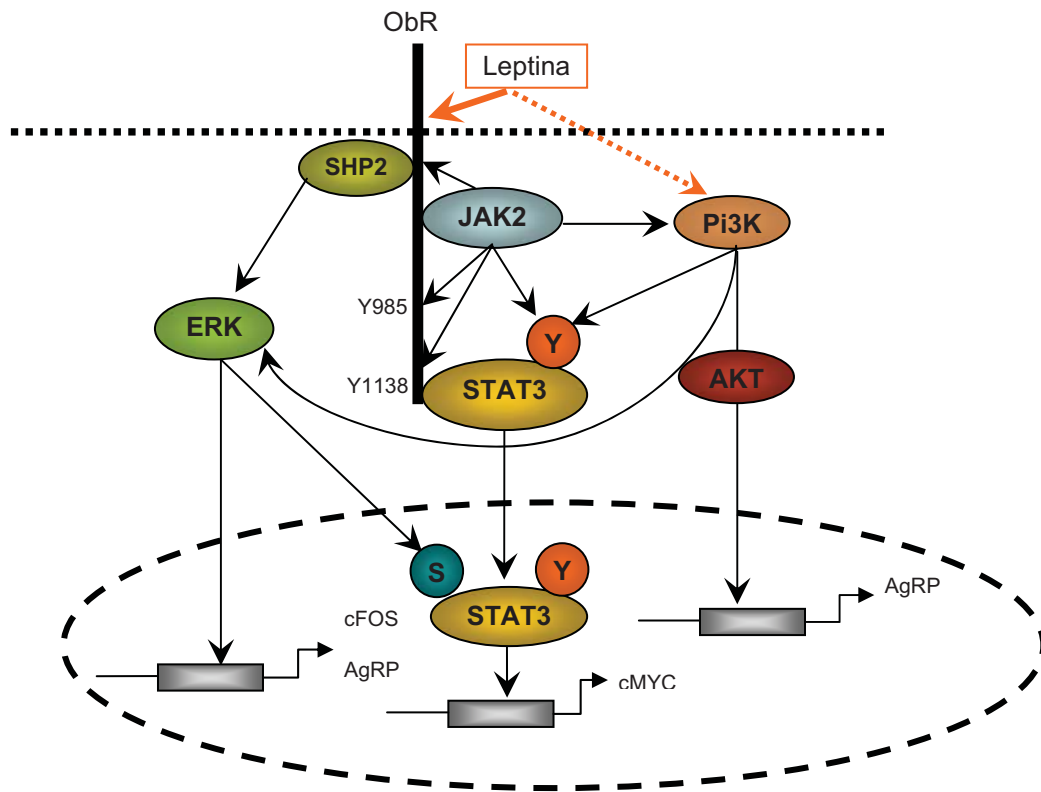


Figura 2. Esquema representatiu de l'acció de la leptina sobre la seva via de senyalització, en la línia cel·lular hipotalàmica N29/4.

No hem d'oblidar en cap moment que mentre la leptina promou una activitat cinasa a partir del seu efecte sobre el receptor, l'activitat del tungstat consisteix en inhibir les fosfatases. Per tant, tot i que el resultat final sigui el mateix (augmentar els nivells de fosforilació), els mecanismes d'acció entre les dos molècules són diferents. Això explica el motiu pel qual molts dels efectes de la leptina van lligats en cadena (si perdem el primer, perdem els que hi van lligats), mentre que el tungstat té efectes independents sobre les diferents fosforilacions (actuant sobre les fosfatases de cada proteïna).

El cas de la regulació del gen *Npy* mereix una menció especial: el fet que no es vegi afectat pel tractament amb tungstat, i que l'acció de la leptina sobre aquesta expressió no es perdi amb cap dels inhibidors utilitzats mostra que, en les cèl·lules N29/4, aquest gen ha d'estar regulat per mecanismes independents als descrits. S'ha demostrat que *Npy* pot ser regulat via ERK [289] i per via AKT [170, 287] (ambdós descartats com a reguladors del gen en el nostre sistema) i per via PKC [294-296]. Caldria veure si aquesta proteïna podria ser la causant de la regulació del gen *Npy* per part de la leptina.

Objectiu II:

Comparació proteica dels nuclis ARC, PVN i LHA

Els anàlisis dels resultats es van iniciar amb l'estudi de les proteïnes diferencials obtingudes a partir de la comparació dels animals prims i obesos. El número de proteïnes obtingut no era gaire elevat, mostrant que a nivell d'expressió proteica, en aquests nuclis hipotalàmics no hi havia masses canvis.

Aquest fet podria ser degut a que els canvis més evidents a nivell de proteïna es donen a l'inici de la dieta rica en greixos [297-300]. En una alimentació amb dieta hipercalòrica s'observa que des dels primers moments, les neurones de l'hipotàlem ja presenten resistència a la insulina [299, 300], fins i tot abans que l'animal esdevingui diabètic i/o obès. A partir d'aquest moment, l'animal presenta un procés adaptatiu que podria explicar les poques diferències obtingudes a nivell d'expressió proteica en el nostre model.

La majoria de les proteïnes obtingudes en aquesta comparació apareixien també en els animals tractats (els canvis van en el mateix sentit), i de forma molt més magnificada. Per això, aquests resultats s'analitzen més profundament en l'anàlisi del tractament amb tungstat.

Són moltes les proteïnes alterades pel tractament amb el tungstat detectades en els gels 2D. Gran part d'aquestes proteïnes es podien classificar en dues categories o funcions: proteïnes involucrades en el metabolisme de la glucosa (ja s'ha descrit el paper del tungstat en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa [238, 264, 265]), i un altre grup de proteïnes involucrades en el creixement axonal i la plasticitat neuronal. Aquesta possible funció del tungstat era completament nova, i és la que ens va cridar més l'atenció. És aquí on vam centrar els nostres estudis.

Els neurofilaments (o filaments intermedis) formen part d'una gran família de proteïnes, dividida en diverses subfamílies segons la seva massa molecular [267, 268, 301]. En els nostres estudis vam detectar diverses proteïnes d'aquesta família alterades pel tractament amb tungstat: *Alpha-internexin* (neurofilament del tipus IV), *Neurofilament medium polypeptide* (neurofilament del tipus IV) i la *Glial fibrillary acidic protein* (neurofilament del tipus III). Estudiant la bibliografia es va observar que totes aquestes proteïnes estan regulades per ERK 1/2 i STAT3 [266, 268-270]. Tenint en compte que en aquesta tesi ha quedat fortament demostrat que el tungstat regula positivament l'activació d'ERK 1/2 i STAT3, tan *in vivo* com *in vitro*, el fet que el tungstat moduli també la funció d'aquesta família de proteïnes dóna encara més èmfasi i importància a aquest aspecte de l'activitat del tungstat.

Juntament amb la família dels neurofilaments, en els nostres resultats apareixia una altra proteïna implicada de forma directa en el creixement axonal, la Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2 o CRMP2). Aquesta proteïna apareixia en tots els nuclis hipotalàmics analitzats, i en les diferents condicions estudiades, suggerint un rol important del tungstat en la seva regulació.

Aquesta proteïna s'uneix als heterodímers de tubulina per promoure i permetre l'acoblament dels microtúbuls, i per tant, el creixement axonal [271]. Ulip2 està directament regulada per la proteïna ERK 1/2 (activadora) i GSK3 β (inhibidora) (figura 2) [272, 273], ambdues proteïnes regulades pel tungstat a sistema nerviós central (dades demostrades en aquesta tesi, [263]) i en altres tipus cel·lulars [246, 275].

Estudiant la via de senyalització que regula Ulip2 (figura 3) observem que el tungstat podria ser un clar candidat a modular l'acció d'aquesta proteïna.

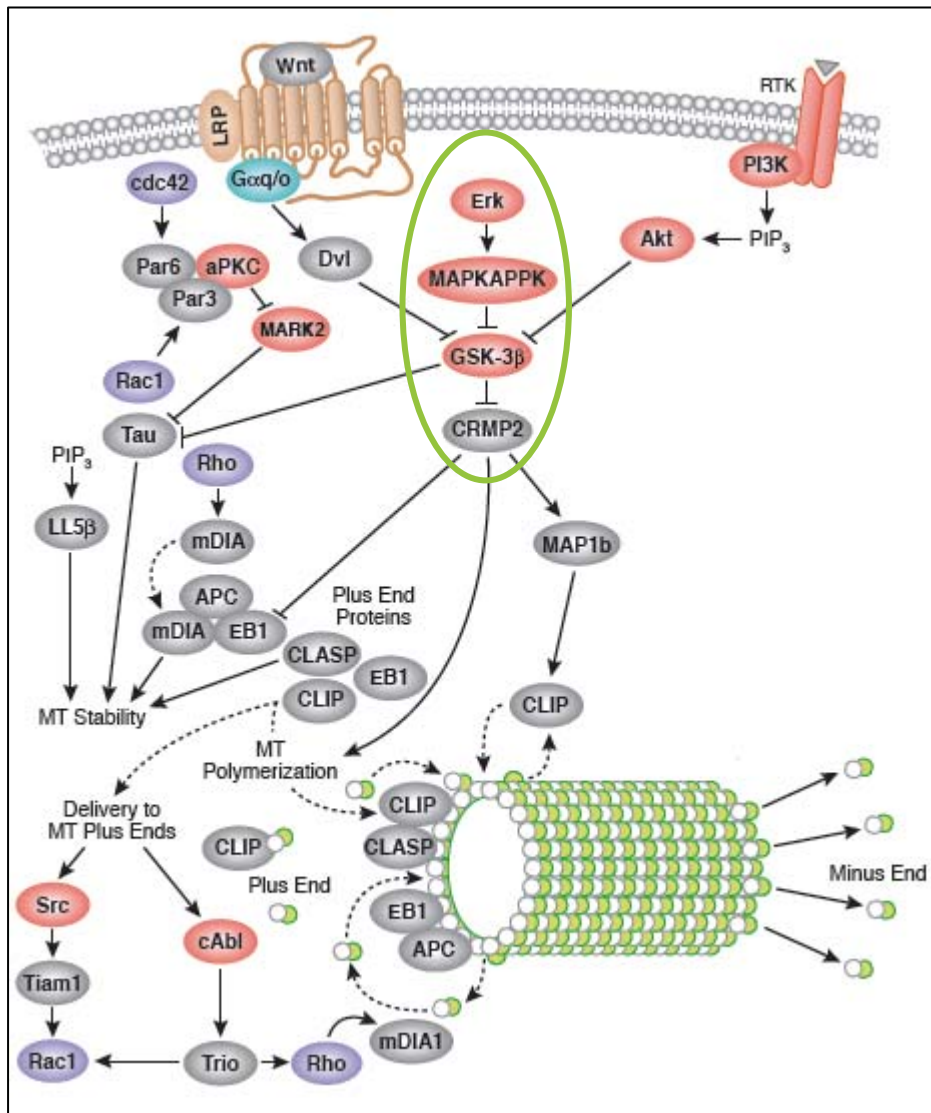


Figura 3. Esquema de la regulació dels microtúbuls (adaptació de Cell Signaling, www.cellsignal.com). En verd s'ha encerclat la regulació d'Ulip2 (CRMP2) per part d'ERK 1/2 i GSK3β.

La proteïna Ulip2, com s'ha descrit àmpliament en l'apartat de resultats, es pot fosforilar en 15 residus diferents [160, 266, 271-273, 277]. En la bibliografia s'han descrit els efectes de només algunes d'aquestes fosforilacions [160, 273, 276, 277], mostrant que quan la proteïna es troba fosforilada, és inactiva. Però en tots els estudis

realitzats es parla de fosforilacions úniques i independents, mai d'estats d'hiperfosforilació de la proteïna en múltiples residus simultàniament.

Tenint en compte aquest buit de coneixement sobre la regulació i activitat de la proteïna, no podem dir si en el nostre sistema es troba activa o inactiva.

Per tant, tots aquests resultats donen evidències suficients per creure que el tungstat podria estar desenvolupant una funció important en el creixement axonal i la plasticitat neuronal. Caldria estudiar detingudament si realment existeix remodelació del citoesquelet o un creixement axonal incrementat després del tractament amb el tungstat, obrint així una nova via d'estudi. Per analitzar aquest aspecte caldria realitzar experiments *in situ*, *in vivo* o *in vitro*, per analitzar el comportament dels axons després del tractament.

Tal i com s'ha descrit en la introducció, la leptina juga un paper fonamental en la formació de circuits neuronals durant els primers estadis del desenvolupament [53, 181, 202, 203, 209]. La correcta connexió neuronal entre els diferents nuclis hipotalàmics és un punt clau per la futura regulació homeostàtica de l'animal adult. Deficiències en aquesta senyalització donaran lloc a desregulacions en el balanç energètic, contribuint en el desenvolupament de l'obesitat [200, 220, 302]. Els efectes leptina sobre la formació de circuits neuronals no s'han observat mai en animals adults.

Per tant, tenint en compte tot això, el fet que el tungstat, en animals adults, fos capaç de reestructurar o regenerar circuits neuronals deficients, seria importantíssim per restablir l'ordre homeostàtic. Tot i que caldria corroborar la manca d'efectes de la leptina sobre el creixement neuronal *in vivo*, la regulació de la plasticitat neuronal per part del tungstat obre noves vies de recerca i teràpia en l'àmbit de l'obesitat.

VI. Conclusions

*Si no tanques fort els ulls,
hi ha moltes coses que no es veuen.*

Adolfo Cabrales.

- El tungstat de sodi travessa ràpidament la barrera hematoencefàlica després de la seva administració via ip.
- El tungstat de sodi té efectes directes sobre el sistema nerviós central, reduint la ingesta i el guany de pes corporal dels animals tractats, amb un poder comparable al de la leptina.
- El tractament amb tungstat de sodi té efectes directes sobre la transducció del senyal *in vivo*, activant la via de senyalització de la leptina.
- El tractament amb tungstat de sodi activa tant la via de senyalització de la leptina *in vitro*, com les seves accions *downstream*, a través de les seves dianes JAK2 i ERK 1/2. Tot i activar també AKT, no hem pogut identificar els efectes lligats a aquesta activació.
- El tractament oral amb tungstat de sodi modifica l'expressió de diverses proteïnes, entre elles, algunes involucrades en la plasticitat neuronal i el creixement axonal, suggerint un rol important de la molècula en aquestes accions.
- Tots els resultats exposats suggereixen que el tungstat de sodi actua, en alguns aspectes, com un mimètic de la leptina a nivell neuronal, modulant la via de transducció del senyal de l'hormona, i possiblement modulant la plasticitat neuronal. Aquests efectes obren noves vies pel tractament de l'obesitat.

VII. Annex

Taula 1. Informació sobre les proteïnes identificades per espectrometria de masses.**Nucli Arcuat**

Obesos vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pl	MW	pl			
212	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	66	5,7	62,5	5,95	1,3	152	0,026
390	Q9CZ13	Citocrom b-c1 complex sub1, mitochondrial (complex III sub1)	50	5,6	53,92	5,75	1,18	701	0,0077
920	P63017	Heat shock protein 70 cognate	66	5,1	70,98	5,37	1,4	604	0,07
1842	P16125	Lactate dehydrogenase B	38	5,5	36,83	5,7	1,42	378	0,064

Controls tractats vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pl	MW	pl			
98	P48722	APG-1 / Heat shock 70 kDa protein 4L	80	5,8	95,28	5,54	1,19	488	0,021
213	O08553	Heat shock 70 kDa protein 4L	66	5,6	62,63	5,95	1,61	302	0,011
215	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	66	5,8	62,5	5,95	1,34	69	0,012
244	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	66	5,3	62,5	5,95	-1,19	74	0,031
297	P46660	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	58	5,3	55,52	5,23	-1,8	1630	0,024
415	P14152	Alpha-internexin (Neurofilament-66)	44	6,5	36,62	6,16	-1,21	64	0,044
431	Q04447	Malate dehydrogenase cytoplasmic	44	5,5	42,93	5,4	1,14	690	0,0029
479	P14152	Creatin Kinase B-type	38	6	36,62	6,16	1,2	288	0,027
1419	P17182	Malate dehydrogenase cytoplasmic	50	6,4	51,7	6,37	1,36	660	0,04
1604	Q9Z2Q6	Enolase 1	40	6,1	36,6	6,21	1,33	222	0,036
	P14152	Septin-5 (Cell division control-related protein 1)			36,62	6,16		53	

Obesos tractats vs Obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pl	MW	pl			
62	P08553	Neurofilament medium polypeptide	95	4	95,99	4,76	1,5	624	0,037
1224	P62814	Vacuolar H+ATPase B2	50	5,5	56,85	5,57	1,61	357	0,013
	P68369	Alpha-tubulin-1A chain			50,81	4,94		214	
	Q8BKZ9	Piruvate dehydrogenase, mitochondrial			54,25	7,62		121	
1475	P60710	Beta-actin	42	4,9	42,19	5,29	1,21	454	0,017
	Q04447	Creatin kinase B			42,97	5,4		169	
	P03995	Glial fibrillary acidic protein (Gfap)			48,49	5,28		153	
1058	Q8BXF8	Actin-related protein 1 homolog B	50	6,7	42,36	5,43	-1,21	412	0,047
	P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1			43,79	6,24		128	
1559	P60710	Beta-actin	44	4,9	42,12	5,29	1,63	159	0,028

Nucli paraventricular

Obesos vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pl	MW	pl			
126	Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	90	5,2	89,9	5,14	1,83	224	0,034
233	P63018	Heat shock protein 70 cognate	66	5,5	71	5,37	1,19	127	0,056
360	Q00624	Apolipoprotein A-I	28	5,3	30,3	5,64	1,21	310	0,0021
428	Q9ROY6	Adenylate kinase isoenzyme 1	26	5,6	23,3	5,67	1,51	408	0,0049

Controls tractats vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pI	MW	pI			
141	P50518	V-type proton ATPase subunit E 1	30	8,2	26,2	8,44	-1,17	373	0,046
242	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	66	5,6	62,6	5,95	1,34	324	0,021
	P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A			68,56	5,42		241	
277	Q9DCT2	NADH dehydrogenase, mitochondrial	30	5,4	30,3	6,67	1,72	282	0,015
329	Q00623	Apolipoprotein A-I	29	5,5	31	5,64	1,32	92	0,02
	Q9DCT2	NADH dehydrogenase, mitochondrial			30	6,67		82	
	P70202	Latexin			25,6	5,48		74	

Obesos tractats vs Obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pI	MW	pI			
232	P63017	Heat shock protein 70 cognate	66	5,5	71	5,37	1,4	127	0,068
278	P46660	Alpha-internexin (Neurofilament-66)	55	5,5	55,5	5,23	-1,1	964	0,022
303	P17751	Triosafofat isomerasa	28	8	27	6,9	-1,82	572	0,023
359	Q00623	Apolipoproteïna A-I	28	5,3	30,3	5,64	-1,6	310	0,0021
428	Q9ROY5	Adenilat cinasa, isoenzim 1	26	5,6	23,3	5,67	-1,77	408	0,0092
540	P61982	14-3-3 proteïna gamma	30	4,5	27,9	4,8	1,16	553	0,06
	P63101	Superòxid dismutasa, mitocondrial			27,9	4,73		415	
567	Q811J3	Aconitasa 2, mitocondrial	80	7,8	86,1	6,41	-1,77	466	0,034

Àrea lateral hipotalàmica

Obesos vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pI	MW	pI			
641	Q9D0F9	Phosphoglucomutase-1	60	6,5	61,7	6,3	1,9	496	0,0023

Controls tractats vs Controls

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pI	MW	pI			
149	P63017	Heat shock protein 70 cognate	70	5	71,02	5,37	-1,51	753	0,052
217	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	64	6,8	62,63	5,95	-1,32	463	0,061
219	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	64	6,1	62,63	5,95	-1,41	553	0,029
224	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)	64	6,2	62,63	5,95	-1,61	613	0,0064
361	P21550	Enolase 3	45	6,1	47,3	6,73	-1,21	55	0,028
373	P17182	Enolase 1	45	7	47,4	6,37	-1,62	420	0,052
385	P17182	Enolase 1	45	6,8	47,4	6,37	-1,41	825	0,055
518	P14152	Malate dehydrogenase cytoplasmic	39	5,8	36,6	6,16	-1,21	245	0,023
636	A2AQ07	Tubulin beta1	66	6,5	57,9	4,96	-1,81	71	0,033
664	P62880	Guanine nucleotide binding protein beta 2	39	5,4	38	5,6	-1,42	431	0,049
	Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 beta			35,1	6,41		251	

Obesos tractats vs Obesos

Taca	UniProt	Proteïna	Taca gel		proteïna real		ràtio	Puntuació	p-Valor
			MW	pl	MW	pl			
176	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (Ulip2)			62,6	5,95		382	
230	P52480	Pyruvate kinase	60	7	58,3	7,17	1,43	429	0,015
648	P15105	Glutamine synthetase	40	7,2	42,9	6,64	1,61	234	0,059
	P35486	Pyruvate dehydrogenase E1, mitochondrial			43,8	8,49		93	

Taula 1. Llista de les proteïnes identificades mitjançant espectrometria de masses dels tres nuclis hipotalàmics analitzats per proteòmica. La primera columna correspon al número de taques assignat durant l'anàlisi amb el software DeCyder. La segona columna correspon al número d'accés de la base de dades UniProt. La tercera columna correspon al nom de la proteïna. La quarta i cinquena columnes corresponen a la massa molecular (MW) i punt isoelèctrics (pl) de les taques obtingudes al gel. La sisena i setena columnes corresponen a la massa molecular (MW) i punt isoelèctric teòrics de la proteïna (informació extreta de la base de dades UniProt). La vuitena columna correspon al ràtio de la proteïna respecte el seu control. La novena columna correspon a la puntuació que rep la identificació de la mostra. Aquesta puntuació és atorgada pel motor de búsqueda MASCOT. No es considera una bona identificació tota aquella que no superi una puntuació ≥ 60 . L'última columna correspon al p-Valor.

VIII. Bibliografia

1. *Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies.* The Lancet, 2004. **363**(9403): p. 157-163.
2. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 635-643.
3. Weisell, R., *Body mass index as an indicator of obesity.* Asia Pac J Clin Nutr, 2002. **11**(8): p. S681-4.
4. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation.* World health organization technical report series, 2000. **894**(i-xii): p. 1-253.
5. Willett, D.W., Colditz GA, *Guidelines for healthy weight.* N Engl J Med, 1999. **341**(6): p. 427-34.
6. Popkin BM, D.C., *The obesity epidemic is a worldwide phenomenon.* Nutrition reviews, 1998. **56**(4): p. 106-14.
7. Mokdad, A.H., *Actual causes of death in the United States, 2000.* JAMA, 2004. **291**(10): p. 293-4.
8. Ogden CL, F.C., Carroll MD, Flegal KM., *Mean body weight, height, and body mass index, United States 1960-2002.* Advance data, 2004. **27**(347): p. 1-17.
9. Martinez JA, M.B., Martinez-Gonzalez MA., *Prevalence of obesity in Spain.* Obesity reviews, 2004. **25**(Suppl 1): p. 171-2.
10. Varo JJ, M.-G.M., Martinez JA., *[Obesity prevalence in Europe].* An Sist Sanit Navar, 2002. **25**(Suppl 1): p. 103-8.
11. Guerrero-Romero F, a.R.-M.M., *Abdominal volume index. An anthropometry-based index for estimation of obesity is strongly related to impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus.* Arch Med Res, 2003. **34**(5): p. 428-32.
12. Froguel, P. and P. Boutin, *Genetics of Pathways Regulating Body Weight in the Development of Obesity in Humans.* Experimental Biology and Medicine, 2001. **226**(11): p. 991-996.
13. Maffei M, H.J., Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Ranganathans S, et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.* Nature medicine, 1995. **1**(11): p. 1155-61.
14. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.* Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-908.
15. Strobel, A., et al., *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity.* Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 213-215.
16. Tartaglia, L.A., *The Leptin Receptor.* J. Biol. Chem., 1997. **272**(10): p. 6093-6096.
17. Krude, H., et al., *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans.* Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 155-157.
18. Jackson, R.S., et al., *Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene.* Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 303-306.
19. Neel, J., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* American journal of human genetics, 1962. **14**: p. 353-62.
20. Hillebrand, J.J.G., D. de Wied, and R.A.H. Adan, *Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus.* Peptides, 2002. **23**(12): p. 2283-2306.
21. Cummings DE, S.M., *Genetics and pathophysiology of human obesity.* Annual review of medicine, 2003. **54**: p. 453-71.
22. Ravussin, E., *Metabolic differences and the development of obesity.* Metabolism, 1995. **44**(Supplement 3): p. 12-14.
23. Wilks, R.e.a., *The Origins and Consequences of Obesity*, ed. Chadwick&Cardew. 1996. 37-53.

24. Kuczmarski RJ, e.a., *Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991.* JAMA, 1994. **272**(3): p. 205-11.
25. Lawrence, V.J. and P.G. Kopelman, *Medical consequences of obesity.* Clinics in Dermatology. **22**(4): p. 296-302.
26. Woods, S.C. and D.A. D'Alessio, *Central control of body weight and appetite.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11): p. S37-S50.
27. Weigle, D.S., *Appetite and the regulation of body composition.* FASEB J., 1994. **8**(3): p. 302-310.
28. Bray, G.A. and C.M. Champagne, *Beyond Energy Balance: There Is More to Obesity than Kilocalories.* Journal of the American Dietetic Association, 2005. **105**(5, Supplement 1): p. 17-23.
29. Kennedy, G., *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat.* Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1953. **140**(901): p. 578-96.
30. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake.* Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-671.
31. Figlewicz, D., Naleid AMD, Sipols AJ., *Modulation of food reward by adiposity signals.* National Institutes of Health, 2007. **91**(5): p. 473-478.
32. Baura, G., *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo.* J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1824.
33. Woods, S.C., *Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons.* Nature, 1979. **282**(5738): p. 503.
34. Zhang, Y.e.a., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature, 1994. **372**(6505): p. 425.
35. Bagdade, J., Bierman EL and Porte D, *The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects.* J Clin Invest, 1967. **46**(10): p. 1549.
36. Considine RV, e.a., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans.* N Engl J Med, 1996. **334**: p. 5.
37. Schwartz, M.W.e.a., *Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans.* Nat Med, 1996. **2**(5): p. 589.
38. Baskin, D., Breininger JF. , Schwartz MW., *Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus.* Diabetes, 1999. **48**(4): p. 828.
39. Cheung CC, C.D., Steiner RA, *Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus.* Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4489.
40. Campfield LA, e.a., *Recombinant OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.* Science, 1995. **269**(5223): p. 546.
41. Weigle, D.e.a., *Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse.* J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 2065.
42. Sipols AJ, B.D., Schwartz MW., *Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression.* Diabetes, 1995. **44**(2): p. 147.
43. Farooqi, I.S., *Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.* N. Engl. J. Med., 1999. **341**: p. 879-884.
44. Hetherington AW, S.R., *Hypothalamic lesions and adiposity in the rat.* Anatomical Records, 1940. **78**: p. 149.
45. Anand BK, B.J., *Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat.* Proc Soc Exp Biol Med, 1951. **77**(2): p. 323.

46. Arora, S. and Anubhuti, *Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review*. *Neuropeptides*, 2006. **40**(6): p. 375-401.
47. Funahashi, H., et al., *Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus*. *Regulatory Peptides*, 2000. **92**(1-3): p. 31-35.
48. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. *Nature*, 1998. **395**(6704): p. 763-770.
49. Schwartz, M.W.e.a., *Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance*. *Endocrinology Reviews*, 1992. **13**(3): p. 387.
50. Myers, M.G., et al., *The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC*. *Cell Metabolism*, 2009. **9**(2): p. 117-123.
51. Nicola Marguerite Neary, A.P.G.S.R.B., *Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus*. *Clinical Endocrinology*, 2004. **60**(2): p. 153-160.
52. Satoh, N., et al., *Pathophysiological Significance of the Obese Gene Product, Leptin, in Ventromedial Hypothalamus (VMH)-Lesioned Rats: Evidence for Loss of Its Satiety Effect in VMH-Lesioned Rats*. *Endocrinology*, 1997. **138**(3): p. 947-954.
53. Elmquist, J.K., et al., *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(2): p. 741-746.
54. Bernardis, L.L. and L.L. Bellinger, *The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1996. **20**(2): p. 189-287.
55. Van der Koody D, K.L., McGinty JF, Bloom FE, *The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat*. *J Comp Neurol*, 1984. **224**(1): p. 1.
56. Ter Horst, G., *Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat*. *Neuroscience* 1989. **31**(3): p. 785.
57. Dumont, Y., A. Fournier, and R. Quirion, *Expression and Characterization of the Neuropeptide Y Y5 Receptor Subtype in the Rat Brain*. *J. Neurosci.*, 1998. **18**(15): p. 5565-5574.
58. Michael J. Glass, J.C.V.M.P., *Ultrastructural localization of neuropeptide Y Y1 receptors in the rat medial nucleus tractus solitarius: Relationships with neuropeptide Y or catecholamine neurons*. *Journal of Neuroscience Research*, 2002. **67**(6): p. 753-765.
59. Yoshihara, T., S. Honma, and K. Honma, *Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996. **270**(4): p. E589-595.
60. Kawai, Y., et al., *The distribution and projection of [gamma]-melanocyte stimulating hormone in the rat brain: An immunohistochemical analysis*. *Brain Research*, 1984. **297**(1): p. 21-32.
61. Williams, G., et al., *The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes*. *Physiology & Behavior*, 2001. **74**(4-5): p. 683-701.
62. Horvath, e.a., *Synaptic plasticity mediating leptin's effect on metabolism*, in *Progress in Brain Research*. 2006, Elsevier. p. 47-55.
63. Elias, C.F., et al., *Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area*, in *Neuron*. 1999. p. 775-786.
64. Adrian, T., Allen, JM., Polak, JM., et al., *Neuropeptide Y distribution in human brain*. *Nature*, 1983. **306**(5943): p. 584.
65. Edwards, C.M., et al., *The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin*. *J Endocrinol*, 1999. **160**(3): p. R7-12.

66. Kalra, S.P. and P.S. Kalra, *NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy*. *Neuropeptides*, 2004. **38**(4): p. 201-211.
67. Stanley, B., Kyrkouli, SE., Lampert, S., Leibowitz, SF., *Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity*. *Peptides*, 1986. **7**(6): p. 1189.
68. Thierry, P., *Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts*. *Neuropeptides*, 2004. **38**(4): p. 267-275.
69. Wilding, J.P., et al., *Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse*. *Endocrinology*, 1993. **132**(5): p. 1939-1944.
70. Gehlert, D.R., *Introduction to the reviews on neuropeptide Y*. *Neuropeptides*, 2004. **38**(4): p. 135-140.
71. Williams, G., J.A. Harrold, and D.J. Cutler, *The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2000. **59**(03): p. 385-396.
72. C. Broberger, L.D.L.J.G.S.T.H., *Hypocretin/Orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems*. *The Journal of Comparative Neurology*, 1998. **402**(4): p. 460-474.
73. Broberger, C., et al., *The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(25): p. 15043-15048.
74. Goldstone, A.P., et al., *Hypothalamic NPY and Agouti-Related Protein Are Increased in Human Illness But Not in Prader-Willi Syndrome and Other Obese Subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(2): p. 927-937.
75. Yang, Y.-k., et al., *Characterization of Agouti-Related Protein Binding to Melanocortin Receptors*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(1): p. 148-155.
76. Rossi, M., et al., *A C-Terminal Fragment of Agouti-Related Protein Increases Feeding and Antagonizes the Effect of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Vivo*. *Endocrinology*, 1998. **139**(10): p. 4428-4431.
77. Bertagna, X., *Proopiomelanocortin-derived peptides*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1994. **23**(3): p. 467.
78. Castro, M., Morrison, E., *Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain*. *Crit Rev Neurobiol*, 1997. **11**(1): p. 35.
79. Pritchard, L.E., A.V. Turnbull, and A. White, *Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity*. *J Endocrinol*, 2002. **172**(3): p. 411-421.
80. Brown KS, G.R., Rowland NE., *Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos*. *Regulatory Peptides*, 1998. **78**(1-3): p. 89-94.
81. Cowley, M.A., et al., *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 480-484.
82. Hoggard, N., et al., *Peripherally administered [Nle4,D-Phe7]-{alpha}-melanocyte stimulating hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti-related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and ob/ob mice*. *J Mol Endocrinol*, 2004. **33**(3): p. 693-703.
83. Murphy, K.G., *Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005. **4**(2): p. 95-111.

84. Elmquist, J., Elias CF., Saper CB., *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight*. *Neuron*, 1999. **22**(2): p. 221-32.
85. Ersin O. Koylu, P.R.C.P.D.L.M.J.K., *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain*. *The Journal of Comparative Neurology*, 1998. **391**(1): p. 115-132.
86. Kristensen, P., et al., *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. *Nature*, 1998. **393**(6680): p. 72-76.
87. Wolden-Hanson, T., B.T. Marck, and A.M. Matsumoto, *Blunted hypothalamic neuropeptide gene expression in response to fasting, but preservation of feeding responses to AgRP in aging male Brown Norway rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(1): p. R138-146.
88. Larsen, P.J., et al., *Chronic Intracerebroventricular Administration of Recombinant CART(42-89) Peptide Inhibits Food Intake and Causes Weight Loss in Lean and Obese Zucker (fa/fa) Rats*. *Obesity*, 2000. **8**(8): p. 590-596.
89. Elias CF, L.C., Kelly J. et al, *Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord*. *Neuron*, 1998. **21**(6): p. 1375-85.
90. Morton, G.J., et al., *Central nervous system control of food intake and body weight*. *Nature*, 2006. **443**(7109): p. 289-295.
91. Strubbe, J.H. and S.C. Woods, *The timing of meals*. *Psychol. Rev.*, 2004. **111**: p. 128-141.
92. Lowell, B.B. and E.S. Bachman, *{beta}-Adrenergic Receptors, Diet-induced Thermogenesis, and Obesity*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(32): p. 29385-29388.
93. Dulloo, A.G. and S. Samec, *Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered*. *British Journal of Nutrition*, 2001. **86**(02): p. 123-139.
94. Dulloo AG., S.J., Jacquet J., *Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance*. *Physiology & Behavior*, 2004. **38**(4): p. 587-602.
95. Stuart, J.A., et al., *Mitochondrial Proton Leak and the Uncoupling Proteins*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1999. **31**(5): p. 517-524.
96. Porter, R.K. and M.D. Brand, *Body mass dependence of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate*. *Nature*, 1993. **362**(6421): p. 628-630.
97. Brand, M.D., *The contribution of the leak of protons across the mitochondrial membrane to standard metabolic rate*. *J Theor Biol*, 1990. **145**(2): p. 267-86.
98. Jansky, L., *Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance*. *Physiol. Rev.*, 1995. **75**(2): p. 237-259.
99. Ježek, P., *Fatty Acid Interaction with Mitochondrial Uncoupling Proteins*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1999. **31**(5): p. 457-466.
100. Harris, R.B.S., T.R. Kasser, and R.J. Martin, *Dynamics of Recovery of Body Composition After Overfeeding, Food Restriction or Starvation of Mature Female Rats*. *J. Nutr.*, 1986. **116**(12): p. 2536-2546.
101. Hervey, G., *The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats*. *The Journal of Physiology*, 1959. **145**(2): p. 336-52.
102. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse*. *J Hered*, 1950. **41**(12): p. 317-318.
103. Coleman, D., *Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice*. *Diabetologia*, 1973. **9**(4): p. 294-8.
104. Coleman, D. and K. Hummel, *The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse*. *Diabetologia*, 1973. **9**(4): p. 287-93.
105. Banks, W., *The many lives of leptin*. *Peptides*, 2004. **25**(3): p. 331-8.

106. Flier, J.S., *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic*. Cell, 2004. **116**(2): p. 337-50.
107. Fruhbeck, G.e.a., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E827-47.
108. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Leptin*. Annual review of physiology, 2000. **62**: p. 413-37.
109. Bado, A.e.a., *The stomach is a source of leptin*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 790-3.
110. Masuzaki, H. and e. al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
111. Morash, B.e.a., *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5995-8.
112. Kline, A.e.a., *Leptin is a four-helix bundle: scodary structure by NMR*. FEBS Lett, 1997. **407**(2): p. 239-42.
113. Prolo, P., Wong, ML., Licinio, J., *Leptin*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(12): p. 1285-90.
114. Zhang, F., et al., *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 206-9.
115. Fruhbeck, G.e.a., *Leptin: physiology and pathophysiology*. Clin physiol, 1998. **18**(5): p. 399-419.
116. Madej, T.e.a., *Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine*. FEBS Lett, 1995. **373**(1): p. 13-8.
117. Becker, W., *Leptin and leptin agonists*, ed. L. Bioscience. 2009.
118. Fruhbeck, G.e.a., *A helicocentric view of leptin*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 301-18.
119. Cumin, F.e.a., *Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(6): p. 495-504.
120. Cumin, F.e.a., *Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20**(12): p. 1120-6.
121. Sinha, M.e.a., *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1277-82.
122. Houseknecht, K.e.a., *Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity*. Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1638-43.
123. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg GG., Hill RA., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*. International journal of obesity 2002. **26**(11): p. 1470.
124. Matarese, G., S. Moschos, and C.S. Mantzoros, *Leptin in Immunology*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3137-3142.
125. Morioka T., A.E., Hu J., et al, *Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**: p. 2860.
126. Lago, F., et al., *The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2007. **18**(3-4): p. 313-325.
127. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-1271.
128. Ceddia, R.B., *Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2005. **29**(10): p. 1175-1183.
129. Chua, S.C., et al., *Fine Structure of the Murine Leptin Receptor Gene: Splice Site Suppression Is Required to Form Two Alternatively Spliced Transcripts*. Genomics, 1997. **45**(2): p. 264-270.
130. Hoggard, N., et al., *Localization of Leptin Receptor mRNA Splice Variants in Murine Peripheral Tissues by RT-PCR andin SituHybridization*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **232**(2): p. 383-387.

131. Lee, G., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
132. Chen, H., et al., *Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice*. Cell, 1996. **84**(3): p. 491-495.
133. Bjorbaek, C. and B.B. Kahn, *Leptin signaling in the central nervous system and the periphery*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**(305-31).
134. Ghilardi N, e.a., *Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**: p. 6231-6235.
135. Luoh, S.M., et al., *Cloning and characterization of a human leptin receptor using a biologically active leptin immunoadhesin*. J Mol Endocrinol, 1997. **18**(1): p. 77-85.
136. Mercer, J.G., et al., *Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization*. FEBS Letters, 1996. **387**(2-3): p. 113-116.
137. Banks, W.A., et al., *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. Peptides, 1996. **17**(2): p. 305-311.
138. White, D.W., et al., *Leptin Receptor (OB-R) Signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(7): p. 4065-4071.
139. Bates, S.H., et al., *STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction*. Nature, 2003. **421**(6925): p. 856-859.
140. Darnell, J.E., Jr., *STATs and Gene Regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-1635.
141. Zhang, Y. and P.J. Scarpace, *The role of leptin in leptin resistance and obesity*. Physiology & Behavior, 2006. **88**(3): p. 249-256.
142. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. Trends in Genetics, 1995. **11**(2): p. 69-74.
143. Banks, A.S., et al., *Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(19): p. 14563-14572.
144. Kloek, C., et al., *Regulation of Jak Kinases by Intracellular Leptin Receptor Sequences*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(44): p. 41547-41555.
145. Bjorbak, C., et al., *Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(7): p. 4747-4755.
146. Barsh, G.S., I.S. Farooqi, and S. O'Rahilly, *Genetics of body-weight regulation*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 644-651.
147. Wen, Z.Z., Zhong; Darnell, JE., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. Cell, 1995. **82**: p. 241-250.
148. O'Rourke, L., *Biphasic regulation of extracellular-signal-regulated protein kinase by leptin in macrophages: role in regulating STAT3 Ser727 phosphorylation and DNA binding*. Biochemical Journal, 2002. **364**: p. 875-879.
149. Chung, J., et al, *STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation*. Molecular and cellular biology, 1997. **17**(11): p. 6508-6516.
150. Decker, T., *Serine phosphorylation of STATs*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2628-2637.
151. Bjorbaek, C., et al., *Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(51): p. 32686-32695.
152. Myers, M.G., Jr., *Leptin Receptor Signaling and the Regulation of Mammalian Physiology*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**(1): p. 287-304.
153. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem. J., 2003. **374**(1): p. 1-20.

154. Li, C. and J.M. Friedman, *Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(17): p. 9677-9682.
155. Björnholm, M., et al, *Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1354.
156. Munzberg, H., et al., *Appropriate Inhibition of Orexigenic Hypothalamic Arcuate Nucleus Neurons Independently of Leptin Receptor/STAT3 Signaling*. J. Neurosci., 2007. **27**(1): p. 69-74.
157. Munzberg, H., et al., *Leptin receptor actions and mechanisms of leptin resistance*. Cell Mol. Life Sci, 2005. **62**: p. 642-52.
158. Bjorbak, C., et al., *SOCS3 Mediates Feedback Inhibition of the Leptin Receptor via Tyr985*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(51): p. 40649-40657.
159. Dunn, S.L., et al., *Feedback Inhibition of Leptin Receptor/Jak2 Signaling via Tyr1138 of the Leptin Receptor and Suppressor of Cytokine Signaling 3*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 925-938.
160. Uchida, Y., et al., *Semaphorin3A Signaling Mediated by Fyn-dependent Tyrosine Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 2 at Tyrosine 32*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(40): p. 27393-27401.
161. Howard, J.K. and J.S. Flier, *Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2006. **17**(9): p. 365-371.
162. Mori, H., et al., *Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 739-43.
163. Kim, Y.-B., et al., *In Vivo Administration of Leptin Activates Signal Transduction Directly in Insulin-Sensitive Tissues: Overlapping but Distinct Pathways from Insulin*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2328-2339.
164. Kellerer, M., *Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways*. Diabetologia, 1997. **40**: p. 1358-1362.
165. Minokoshi, Y., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus*. Nature, 2004. **428**: p. 569-574.
166. Thornton, J.E., et al., *Regulation of Hypothalamic Proopiomelanocortin mRNA by Leptin in ob/ob Mice*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 5063-5066.
167. Munzberg, H., et al., *Role of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Regulation of Hypothalamic Proopiomelanocortin Gene Expression by Leptin*. Endocrinology, 2003. **144**(5): p. 2121-2131.
168. Xu, A.W., et al., *Inactivation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Proopiomelanocortin (Pomc) Neurons Causes Decreased Pomc Expression, Mild Obesity, and Defects in Compensatory Refeeding*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 72-80.
169. Sahu, A., *Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance*. Frontiers in Neuroendocrinology, 2003. **24**(4): p. 225-253.
170. Morrison, C.D., et al., *Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(6): p. E1051-1057.
171. Lord, G.e.a., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
172. Colombo G, A.R., Gessa GL et al, *Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716*. Life sciences, 1998. **63**(8): p. PL113-7.

173. Brurcelin, R.e.a., *Acute intravenous leptin infusion increases glucose turnover but not skeletal muscle glucose uptake in ob/ob mice*. Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1264-9.
174. Muoio, D. and G. Dohm, *Peripheral metabolic actions of leptin*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. **16**(4): p. 653-66.
175. Sahu, A., *Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2613-20.
176. Cioffi, J.e.a., *Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 585-9.
177. Fruhbeck, G., *Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 903-8.
178. Considine, R.V., et al., *Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-295.
179. Farooqi, I.S., *Monogenic human obesity*. Front Horm Res., 2008. **36**: p. 1-11.
180. Maffei, M., Stoffel M, and Barone M, *Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects*. Diabetes 1996. **45**(5): p. 679-82.
181. Bouret, S.G. and R.B. Simerly, *Developmental programming of hypothalamic feeding circuits*. Clinical Genetics, 2006. **70**(4): p. 295-301.
182. El-Haschimi, K., et al., *Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(12): p. 1827-1832.
183. Munzberg, H., J.S. Flier, and C. Bjorbaek, *Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice*. Endocrinology, 2004. **145**: p. 4880-4889.
184. Banks, W.A. and C.L. Farrell, *Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(1): p. E10-15.
185. Prpic, V., et al., *Differential Mechanisms and Development of Leptin Resistance in A/J Versus C57BL/6J Mice during Diet-Induced Obesity*. Endocrinology, 2003. **144**(4): p. 1155-1163.
186. Van Heek, M. and H.R.J. Davis, *Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin*. J Clin Invest, 1997. **99**(3): p. 385-390
187. Scarpace, P.J. and Y. Zhang, *Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(3): p. R493-500.
188. Bence, K.K., et al., *Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 917-924.
189. Phillips, M.S., et al., *Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 18-9.
190. Ernsberger, P., R.J. Koletsky, and J.E. Friedman, *Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 272-88.
191. Takaya, K., et al., *Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 130-1.
192. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
193. Coleman, D.L., *Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice*. Diabetologia, 1973. **9**(4): p. 294-8.
194. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
195. Leiter, E.H., *new mutation (db3J) at the diabetes locus in strain 129/J mice. II. Studies of pancreatic alpha cell function in culture*. Diabetologia, 1980. **19**(1): p. 66-73.

196. McEwen, B.S., E.R. De Kloet, and W. Rostene, *Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system*. *Physiol. Rev.*, 1986. **66**(4): p. 1121-1188.
197. Bernal, J., *Action of thyroid hormone in brain*. *J Endocrinol Invest*, 2002. **25**: p. 268.
198. Madeira, M.D., *Sexual dimorphism in the mammalian limbic system* *Progress in Neurobiology*, 1995. **45**(4): p. 275-313.
199. Bouret, S., Draper SJ, Simerly RB. , *Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding*. *Science*, 2004. **304**(5667): p. 63-4.
200. Bouret, S.G., et al., *Hypothalamic Neural Projections Are Permanently Disrupted in Diet-Induced Obese Rats*. *Cell Metabolism*, 2008. **7**(2): p. 179-185.
201. Bouret, S.G. and R.B. Simerly, *Minireview: Leptin and Development of Hypothalamic Feeding Circuits*. *Endocrinology*, 2004. **145**(6): p. 2621-2626.
202. Ahima, R.S. and S.M. Hileman, *Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation* *Regulatory Peptides*, 2000. **92**(1-3): p. 1-7.
203. Proulx, K., D. Richard, and C.-D. Walker, *Leptin Regulates Appetite-Related Neuropeptides in the Hypothalamus of Developing Rats without Affecting Food Intake*. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4683-4692.
204. Mistry, A.M., A. Swick, and D.R. Romsos, *Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 1999. **277**(3): p. R742-747.
205. Matsuda, J., et al., *Developmental Changes in Long-Form Leptin Receptor Expression and Localization in Rat Brain*. *Endocrinology*, 1999. **140**(11): p. 5233-5238.
206. Udagawa, J. and T. Hatta, *Expression of the long form of leptin receptor (Ob-Rb) mRNA in the brain of mouse embryos and newborn mice* *Brain Research*, 2000. **868**(2): p. 251-258.
207. Bouret, S.G., S.J. Draper, and R.B. Simerly, *Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice*. *J. Neurosci.*, 2004. **24**(11): p. 2797-2805.
208. Elmquist, J.K., et al., *Leptin Activates Neurons in Ventrobasal Hypothalamus and Brainstem*. *Endocrinology*, 1997. **138**(2): p. 839-842.
209. Carol, F.E., et al., *Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain*. *The Journal of Comparative Neurology*, 2000. **423**(2): p. 261-281.
210. Morgan, J.I. and T. Curran, *Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes fos and jun*. *Annual Review of Neuroscience*, 1991. **14**(1): p. 421-451.
211. Armstrong, R.C. and M.R. Montminy, *Transsynaptic Control of Gene Expression*. *Annual Review of Neuroscience*, 1993. **16**(1): p. 17-29.
212. Ahima, R.S., D. Prabakaran, and J.S. Flier, *Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. **101**(5): p. 1020-1027.
213. Devaskar, S.U. and C. Ollesch, *Developmental Changes inobGene Expression and Circulating Leptin Peptide Concentrations*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997. **238**(1): p. 44-47.
214. Bereiter, D. and B. Jeanrenaud, *Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse* *Brain Research*, 1979. **165**(2): p. 249-260.
215. Bereiter, D. and B. Jeanrenaud, *Altered dendritic orientation of hypothalamic neurons from genetically obese (ob/ob) mice*. *Brain Research*, 1980. **202**(1): p. 201-206.

216. Sena, A. and L. Sarlieve, *Brain myelin of genetically obese mice*. J Neurol Sci, 1985. **68**: p. 233-243.
217. Steppan, C.M. and A. Swick, *A Role for Leptin in Brain Development* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **256**(3): p. 600-602.
218. Ahima, R.S., et al., *Regulation of Neuronal and Glial Proteins by Leptin: Implications for Brain Development*. Endocrinology, 1999. **140**(6): p. 2755-2762.
219. Proulx, K., et al., *High Neonatal Leptin Exposure Enhances Brain GR Expression and Feedback Efficacy on the Adrenocortical Axis of Developing Rats*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4607-4616.
220. Dietz, W., *Critical periods in childhood for the development of obesity*. Am J Clin Nutr, 1994. **59**(955-959).
221. Simerly, R.B., *WIRED FOR REPRODUCTION: Organization and Development of Sexually Dimorphic Circuits in the Mammalian Forebrain*. Annual Review of Neuroscience, 2002. **25**(1): p. 507-536.
222. Kopelman, P.G.G., C., *New thoughts on managing obesity*. Gut, 2004. **53**: p. 1044-1053.
223. Kopelman, P.G., *Clinical treatment of obesity: are drugs and surgery the answer?* Proceedings of the Nutrition Society, 2005. **64**: p. 65-71.
224. Hauptman, J.B., F.S. Jeunet, and D. Hartmann, *Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin)*. Am J Clin Nutr, 1992. **55**(1): p. 309S-313.
225. Schwizer W, A.K., Fried M., *Role of lipase in the regulation of upper gastrointestinal function in humans*. Am J Physiol., 1997. **273**(3 Pt 1): p. G612-20.
226. Hildebrand P, P.C., Beglinger C., *Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 123-9.
227. Sjöström, L., et al., *Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients*. The Lancet, 1998. **352**(9123): p. 167-172.
228. Heal DJ, A.S., Prow MR, Cheetham SC., *Sibutramine: a novel anti-obesity drug. A review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine*. International journal of obesity and related metabolic disorders, 1998. **22**(Suppl 1): p. S18-28.
229. Zanella, M., Flexa-Ribeiro, FF., *Emerging drugs for obesity therapy*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2009. **53**(2): p. 271.
230. Silva, F.d., *The biological chemistry of the elements. The inorganic chemistry of life*. Oxford: Clarendon Press, 1991: p. 411-435.
231. Kletzin, A.M.A., *Tungsten in biological systems*. FEMS Microbiol Rev, 1996. **18**(1): p. 5-63.
232. L'Vov N, P., A.N. Nosikov, and A.N. Antipov, *Tungsten-containing enzymes*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(2): p. 196-200.
233. Meyer, O., *The bacterial molybdenum cofactor*. In: *Molybdenum enzymes, cofactors and model systems*. Washington D.C.: ACS Symposium Series, 1993. **267**(15): p. 10199-202.
234. Stankiewicz, P.a.G., MJ., *Inhibition of phosphatases and sulfatases by transition-state analogues*. Biochemistry, 1988. **27**(1): p. 206-12.
235. Stuckey, J.e.a., *Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate*. Nature, 1994. **370**(6490): p. 571-5.
236. Lund, I.e.a., *Structure-based design of selective and potent inhibitors of protein-tyrosine phosphatase beta*. J Biol Chem, 2003. **279**(23): p. 24226-35.
237. Weigle, D.S., *Pharmacological Therapy of Obesity: Past, Present, and Future*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2462-2469.

238. Barbera, A., J.E. Rodríguez-Gil, and J.J. Guinovart, *Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(31): p. 20047-20053.
239. Barbera, A.e.a., *Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia*. Diabetologia, 1997. **40**(2): p. 143-9.
240. Fernandez-Alvarez, J.e.a., *Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 470-7.
241. Munoz, M.C., et al., *Effects of Tungstate, a New Potential Oral Antidiabetic Agent, in Zucker Diabetic Fatty Rats*. Diabetes, 2001. **50**(1): p. 131-138.
242. Claret, M., et al., *Tungstate Decreases Weight Gain and Adiposity in Obese Rats through Increased Thermogenesis and Lipid Oxidation*. Endocrinology, 2005. **146**(10): p. 4362-4369.
243. Prats, E., et al., *Energy intake of rats fed a cafeteria diet*. Physiology & Behavior, 1989. **45**(2): p. 263-72.
244. Barcelo-Batlloiri, S., et al., *Integration of DIGE and Bioinformatics Analyses Reveals a Role of the Antiobesity Agent Tungstate in Redox and Energy Homeostasis Pathways in Brown Adipose Tissue*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 378-393.
245. Canals, I., et al., *A functional leptin system is essential for sodium tungstate antiobesity action*. Endocrinology, 2008. **150**(2): p. 642.
246. Carmona, M.C., et al., *Dual effects of sodium tungstate on adipocyte biology: inhibition of adipogenesis and stimulation of cellular oxygen consumption*. Int J Obes, 2009.
247. Sílvia Barceló-Batlloiri, H.C.M.C.I.C.J.G.R.G., *Target identification of the novel antiobesity agent tungstate in adipose tissue from obese rats*. PROTEOMICS, 2005. **5**(18): p. 4927-4935.
248. Domingo, J., *Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects*. Biol Trace Elem Res, 2002. **88**(2): p. 97-112.
249. Fagin, J.A., K. Ikejiri, and S.R. Levin, *Insulinotropic effects of vanadate*. Diabetes, 1987. **36**(12): p. 1448-52.
250. Heyliger, C.E., A.G. Tahiliani, and J.H. McNeill, *Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats*. Science, 1985. **227**(4693): p. 1474-7.
251. Matsumoto, J., *Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine*. Medical Hypotheses, 1994. **43**(3): p. 177-182.
252. Bosch, F., et al., *Lithium inhibits hepatic gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2888-93.
253. Rodríguez-Gil, J.E., J.J. Guinovart, and F. Bosch, *Lithium restores glycogen synthesis from glucose in hepatocytes from diabetic rats*. Arch Biochem Biophys, 1993. **301**(2): p. 411-5.
254. Barbera, A., et al., *Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study*. Diabetologia, 2001. **44**(4): p. 507-13.
255. Fernandez-Alvarez, J., et al., *Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate*. Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 470-7.
256. Domínguez, J.E., et al., *The Antidiabetic Agent Sodium Tungstate Activates Glycogen Synthesis through an Insulin Receptor-independent Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(44): p. 42785-42794.
257. Furnsinn, C., et al., *Insulin-like vs. non-insulin-like stimulation of glucose metabolism by vanadium, tungsten, and selenium compounds in rat muscle*. Life Sci, 1996. **59**(23): p. 1989-2000.

258. Giron, M.D., et al., *The glucose-lowering agent sodium tungstate increases the levels and translocation of GLUT4 in L6 myotubes through a mechanism associated with ERK1/2 and MEF2D*. Diabetologia, 2008. **51**(7): p. 1285-95.
259. Al-Awwadi, N., et al., *Differential effects of sodium tungstate and vanadyl sulfate on vascular responsiveness to vasoactive agents and insulin sensitivity in fructose-fed rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2004. **82**(10): p. 911-8.
260. Nagareddy, P.R., H. Vasudevan, and J.H. McNeill, *Oral administration of sodium tungstate improves cardiac performance in streptozotocin-induced diabetic rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. **83**(5): p. 405-11.
261. Palanivel, R. and D. Sakthisekaran, *Immunomodulatory effect of tungstate on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **958**: p. 382-6.
262. Lemberg, A., et al., *Enzymatic activities in brains of diabetic rats treated with vanadyl sulphate and sodium tungstate*. Acta Physiol Hung, 2007. **94**(4): p. 315-9.
263. Gómez-Ramos, A. and J.D.D.Z.H.C.R.G.J.J.G.J. Avila, *Sodium tungstate decreases the phosphorylation of tau through GSK3 inactivation*. Journal of Neuroscience Research, 2006. **83**(2): p. 264-273.
264. Barbera, A.G.R., Prats N, Rodriguez-Gil JE, Domingo M, Gomis R, *Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced rat: a long term study*. Diabetologia, 2001. **44**(507-513).
265. Fillat, C., J.E. Rodriguez-Gil, and J.J. Guinovart, *Molybdate and tungstate act like vanadate on glucose metabolism in isolated hepatocytes*. Biochem J, 1992. **282**(3): p. 659-663.
266. Veeranna, G. and K. Shetty, *Cdk5 and MAPK are associated with complexes of cytoskeletal proteins in rat brain*. Molecular Brain Research, 2000. **76**(2): p. 229-236.
267. Evans, J., et al., *Characterization of Mitotic Neurons Derived From Adult Rat Hypothalamus and Brain Stem*. J Neurophysiol, 2002. **87**(2): p. 1076-1085.
268. Sihag, R. and M. Inagaki, *Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments* Experimental Cell Research, 2007. **313**(10): p. 2098-2109.
269. Veeranna, et al., *Mitogen-Activated Protein Kinases (Erk1,2) Phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) Repeats in Neurofilament Proteins NF-H and NF-M*. J. Neurosci., 1998. **18**(11): p. 4008-4021.
270. Beurel, E.o. and R.S. Jope, *Differential Regulation of STAT Family Members by Glycogen Synthase Kinase-3*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(32): p. 21934-21944.
271. Fukata, Y., et al., *CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 583-591.
272. Yoshimura, T., et al., *Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3[beta]/CRMP-2 pathway*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **340**(1): p. 62-68.
273. Yoshimura, T., et al., *GSK-3[beta] Regulates Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity*. Cell, 2005. **120**(1): p. 137-149.
274. Alberto, G.-R., et al., *Sodium tungstate decreases the phosphorylation of tau through GSK3 inactivation*. Journal of Neuroscience Research, 2006. **83**(2): p. 264-273.
275. Piquer, S., S. Barcelo-Batllori, and M. Julia, *Phosphorylation events implicating p38 and PI3K mediate tungstate-effects in MIN6 beta cells* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(2): p. 385-391.
276. Cole, A.R., et al., *Relative Resistance of Cdk5-phosphorylated CRMP2 to Dephosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(26): p. 18227-18237.

277. Varrin-Doyer, M., et al., *Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 2 on Tyr-479 Regulates CXCL12-induced T Lymphocyte Migration*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(19): p. 13265-13276.
278. Claret, M., *Mecanismes d'acció del tungstat sòdic sobre el pes corporal i la resistència a la insulina: possible regulació de l'activitat transcripcional del PPAR-gamma.*, in *Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica*. 2003, Universitat de Barcelona: Barcelona.
279. Ostlund, R.J., *Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(11): p. 3909-13.
280. Wong, S.L., et al., *Leptin Hormonal Kinetics in the Fed State: Effects of Adiposity, Age, and Gender on Endogenous Leptin Production and Clearance Rates*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2672-2677.
281. Le Lamer, S., et al., *Pharmacokinetics of Sodium Tungstate in Rat and Dog: A Population Approach*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **294**(2): p. 714-721.
282. Rahmouni, K., et al., *Hypothalamic ERK Mediates the Anorectic and Thermogenic Sympathetic Effects of Leptin*. Diabetes, 2008: p. db08-0822.
283. Ueyama, E., Morikawa, Y., Yasuda, T., Senba, E., *Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding*. Neuroscience Letters, 2004. **371**: p. 40-44.
284. Shimizu-Albergine, M., D.L. Ippolito, and J.A. Beavo, *Downregulation of Fasting-Induced cAMP Response Element-Mediated Gene Induction by Leptin in Neuropeptide Y Neurons of the Arcuate Nucleus*. J. Neurosci., 2001. **21**(4): p. 1238-1246.
285. Katoh, M. and M. Katoh, *STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer*. International Journal of Molecular Medicine, 2007. **19**(2): p. 273-278.
286. Basu, A., *Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes* Virology, 2006. **349**(2): p. 347-358.
287. Gong, L., et al., *Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Is Required in Hypothalamic Agouti-Related Protein/Neuropeptide Y Neurons for Normal Energy Homeostasis*. Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3346-3354.
288. Park, M. and H. Oh, *Enterostatin affects cyclic AMP and ERK signaling pathways to regulate Agouti-related Protein (AgRP) expression* Peptides, 2009. **30**(2): p. 181-190.
289. Mayer, C. and D. Belsham, *Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons* Molecular and Cellular Endocrinology, 2009. **307**(1-2): p. 99-108.
290. Titolo, D., et al., *Estrogen Facilitates both Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Membrane Signaling Required for Long-Term Neuropeptide Y Transcriptional Regulation in Clonal, Immortalized Neurons*. J. Neurosci., 2008. **28**(25): p. 6473-6482.
291. Chai, B., J. Li, and W. Zhang, *Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase* Regulatory Peptides, 2006. **139**(1-3): p. 115-121.
292. Xu, A.W., *PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons*. J. Clin. Invest., 2005. **115**: p. 951-958.
293. Girasol, A., et al., *Fyn Mediates Leptin Actions in the Thymus of Rodents*. PLoS ONE, 2009. **4**(11): p. e7707.
294. Barrenetxe, J., et al., *Involvement of PKC and PKA in the inhibitory effect of leptin on intestinal galactose absorption* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(3): p. 717-721.

295. Maroni, P., P. Bendinelli, and R. Piccoletti, *Intracellular signal transduction pathways induced by leptin in C2C12 cells* Cell Biology International, 2005. **29**(7): p. 542-550.
296. Kuo, D. and e. al., *Amphetamine-evoked changes of oxidative stress and neuropeptide Y gene expression in hypothalamus: Regulation by the protein kinase C- δ signaling* Chemico-Biological Interactions, 2009. **180**(2): p. 193-201.
297. Banas, S., C. Rouch, and N. Kassis, *A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases*. Cell Mol Neurobiol, 2009. **29**(2): p. 157-68.
298. Nefti, W., et al., *A high-fat diet attenuates the central response to within-meal satiation signals and modifies the receptor expression of vagal afferents in mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(6): p. R1681-1686.
299. Clegg, D.J., et al., *Reduced anorexic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate-fat diet*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(4): p. R981-986.
300. Ono, H., et al., *Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats*. The Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(8): p. 2959-2968.
301. Roxanne, C.L. and J. Jean-Pierre, *Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease*. Journal of Neurobiology, 2004. **58**(1): p. 131-148.
302. Jones, A. and M. Friedman, *Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy*. Science, 1982. **215**: p. 1518-1519.